

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN UN
MODELO IN VIVO DE DEFICIENCIA EN VITAMINA E.
PAPEL DE NF- κ B EN LA REGULACIÓN DE LOS GENES DE
LA γ -GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA Y GENES
IMPLICADOS EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR

MARÍA MORANTE HERNÁNDEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 09 de Juliol de 2004 davant un tribunal format per:

- D. Juan Viña Rives
- D. Joaquín Timoneda Timoneda
- D. Federico Pallardo Calatayud
- D. Matías Ávila Zaragoza
- D. Fernando Corrales Izquierdo

Va ser dirigida per:

D^a. Teresa Barber Sanchis

D. Luis Torres Asensi

©Copyright: Servei de Publicacions
María Morante Hernández

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6065-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE FARMACIA

**ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN UN
MODELO *IN VIVO* DE DEFICIENCIA EN VITAMINA E.
PAPEL DE NF- κ B EN LA REGULACIÓN DE LOS GENES
DE LA γ -GLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA Y GENES
IMPLICADOS EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR**

MARÍA MORANTE HERNÁNDEZ

Valencia, 2004



UNIVERSITAT DE VALENCIA. FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

Dña. TERESA BARBER SANCHIS, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

D. LUIS TORRES ASENSI, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

Certifican: que **Dña. MARÍA MORANTE HERNÁNDEZ**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección el presente trabajo de investigación, titulado **"ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN UN MODELO *IN VIVO* DE DEFICIENCIA EN VITAMINA E. PAPEL DE NF- κ B EN LA REGULACIÓN DE LOS GENES DE LA gGLUTAMILCISTEÍNA SINTETASA Y GENES IMPLICADOS EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR"**, el cual posee la suficiente calidad científica para ser presentado en la obtención del grado de Doctor en Farmacia.

Y, para que conste a todos los efectos firman la presente certificación.

En Valencia, a 20 de Abril de 2004

Fdo. Dra. T Barber

Fdo. Dr. L. Torres

**El presente trabajo ha sido realizado con
subvención del Fondo de Investigación
Sanitaria (FIS), Ministerio de Sanidad y
Consumo (PI02/1010)**

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado durante el periodo de disfrute de una Beca F.P.I de la *Conselleria de Cultura, Educació i Ciència* de la Generalitat Valenciana

*" y la vida siguió,
como siguen las cosas que no tienen mucho sentido..."*

*A mis padres,
A mis hermanos,
A mi abue.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a la Dra. Teresa Barber y al Dr. Luis Torres por darme la oportunidad de presentar esta Tesis. Por su empatía, su ayuda, su paciencia, sus consejos, sus enseñanzas y su ejemplo para formarme como investigadora y como persona.

A los profesores miembros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia, en especial al Dr. Vicente Miralles, por embarcarme en el mundo de la bioquímica y al Dr. Joaquín Timoneda, por sus consejos en el laboratorio; a todos ellos por su buen trato y su ayuda en todo momento. A Joan y Joana, que siempre me han echado una mano.

Al Dr. Juan Viña, por sus inestimables consejos y a Concha García, por sufrir mi primer contacto con el laboratorio. Al Dr. Jose Luis Rodríguez, Dr. Gerardo López Rodas y Juan Sandoval por su colaboración en la realización del *ChIP assay* y por sus recomendaciones. Al Dr. Federico Pallardó y a M.Carmen Gómez por su colaboración en el desarrollo de los *EMSAs*. A M. Carmen Tormo por las clases de HPLC. A Pili por su colaboración en la realización de la microscopía electrónica y por su amistad.

A todos aquellos que han compartido horas de laboratorio conmigo. A los que estuvieron en mis principios: Ruth, Chelo, especialmente a Santi, por ser responsable de muchas de las pocas sonrisas que surgieron en los comienzos difíciles. A los que llegaron después: Amparo, Javi, Gert, Vanessa, Dolores y en especial a Guillermo. Y por supuesto, a los que han estado ahí todo el tiempo: a Inma, Elena, Rosa, Luisa, Amparo, por su ayuda, su compañía, sus ánimos, las risas, las charlas, por hacer de la rutina un placer.

A todos aquellos que fuera de estas cuatro paredes han estado ahí, compartiendo mis pequeños fracasos y triunfos de laboratorio. A Merche, Marta y sobre todo a Conchi, por su apoyo incondicional. A Fuen, Mariola, Carol y como no, a Mari Suni ("me sobran los motivos"). A Rafa, Luis (por los veranos y más), a Sergio (por Sabina) y a Josan (por cuidarme y entenderme). Al resto de mi familia, en especial a mis tíos.

Y a todos aquellos que la falta de tiempo o de memoria me han llevado a dejarlos en el tintero, pero que han permitido que esta tesis llegue a buen término y que deberían estar aquí, que me perdonen.

A todos ellos, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

Página

I. INTRODUCCIÓN	1
1. DAÑO OXIDATIVO CELULAR	3
1.1. Estrés oxidativo inducido por radicales libres	3
1.2. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo	4
1.3. Estrés oxidativo y regulación génica	11
1.3.1. Efecto de los radicales libres en la regulación génica	11
1.3.2. NF- κ B	11
1.4. Implicaciones del estrés oxidativo en la degeneración tisular	16
1.4.1. Estrés oxidativo y enfermedad	16
1.4.2. Estrés oxidativo hepático	17
2. VITAMINA E	18
2.1. Aspectos generales	19
2.2. Propiedades y funciones de la vitamina E	21
2.2.1. Función antioxidante de la vitamina E	21
2.2.2. Propiedades no antioxidantes de la vitamina E	22
2.2.3. Vitamina E y enfermedad. Papel en la prevención de patologías	24
2.3. Requerimientos nutricionales de vitamina E	29
2.3.1. Biodisponibilidad de la vitamina E	29
2.3.2. Pautas dietéticas recomendadas de la vitamina E	33
2.4. Suplementación de vitamina E	34
2.5. Deficiencia en vitamina E	35
2.5.1. Etiología. Enfermedades que cursan con deficiencia en vitamina E	35
2.5.2. Efectos de la deficiencia en vitamina E	38
II. OBJETIVOS	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS	45
MATERIAL	47
1. PRODUCTOS Y REACTIVOS	47
2. APARATOS E INSTRUMENTAL	47

	<i>Página</i>
3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	48
4. DIETAS AIN-93	49
 MÉTODOS	 52
1. TRATAMIENTO DIETÉTICO DE LOS ANIMALES	52
2. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	53
3. DETERMINACIÓN DEL INCREMENTO DEL PESO DE LAS CRÍAS Y DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE MATERNA	53
4. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO	54
5. DETERMINACIÓN DE MACROMOLÉCULAS Y METABOLITOS	55
5.1. Cuantificación de α -tocoferol en plasma e hígado	55
5.2. Cuantificación de β -tocoferol y retinol en plasma	56
5.3. Determinación de triacilgliceroles en plasma	57
5.4. Determinación de colesterol en plasma	58
6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	59
6.1. Determinación de aminotransferasas en plasma	59
6.2. Determinación de (fosfo)creatín-quinasa en plasma	61
7. VALORACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO	62
7.1. Valoración de GSH	62
7.2. Valoración de GSSG	64
7.3. Valoración de los niveles de malondialdehído	66
8. ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA HEPÁTICA POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA	68
9. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR	69
9.1. Aislamiento de RNA total	69
9.2. Cuantificación de los niveles de mRNA por RT-PCR	70
10. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES Y ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)	73
10.1. Obtención de extractos nucleares de hígado	73
10.2. EMSA	74
11. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE FRAGMENTOS DE CROMATINA (<i>ChIP assay</i>)	76
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	80

IV. RESULTADOS

81

1. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE DEFICIENCIA CRÓNICA EN VITAMINA E	83
1.1. Producción de leche durante la deficiencia en vitamina E	83
1.2. Seguimiento de la ingesta en ratas controles y deficientes en vitamina E	83
1.3. Seguimiento del peso corporal en ratas controles y deficientes en vitamina E	84
1.4. Concentración de tocoferoles más importantes en plasma en ratas controles y deficientes en vitamina E	85
1.4.1. Concentración de α -tocoferol en plasma	85
1.4.2. Concentración de γ -tocoferol en plasma	86
1.5. Concentración de retinol en plasma	88
1.6. Determinación de parámetros fisiopatológicos en plasma	89
2. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO PRODUCIDO POR LA DEFICIENCIA CRÓNICA DE VITAMINA E	92
2.1. Niveles hepáticos de α -tocoferol en ratas controles y deficientes en vitamina E	92
2.2. La deficiencia en vitamina E provoca una alteración del cociente GSH/GSSG en hígado total	92
2.3. La deficiencia en vitamina E provoca un incremento de la concentración de MDA en hígado total	93
2.4. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre el estrés oxidativo mitocondrial hepático	95
3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E EN LA ULTRAESTRUCTURA HEPÁTICA	96
4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA HEPÁTICA	97
4.1. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de la β -GCS	97

4.2. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de las proteínas desacopladoras de la fosforilación oxidativa (UCPs)	99
4.3. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de las ciclinas y de sus inhibidores	101
4.4. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de <i>c-jun</i>	104
5. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN EL HÍGADO	105
6. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA β -GCS	107
6.1. Inmunoprecipitación de los complejos NF- κ B – DNA	107
6.2. Inmunoprecipitación de los complejos AP-1 – DNA	108
6.3. Inmunoprecipitación de los complejos RNA pol II – DNA	111
7. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA CICLINA D1 POR NF- κ B	114
 V. DISCUSIÓN	 115
 VI. CONCLUSIONES	 131
 VII. BIBLIOGRAFÍA	 135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.	Estudios clínicos de suplementación de vitamina E y enfermedad cardiovascular	26
Tabla III.1.	Composición de la dieta AIN 93-G	50
Tabla III.2.	Oligonucleótidos empleados para el análisis por PCR	72
Tabla III.3.	Oligonucleótidos empleados para las PCR del DNA inmuoprecipitado	79
Tabla IV. 1.	Dieta ingerida por animales controles y deficientes en vitamina E	84
Tabla IV. 2.	Peso corporal de animales controles y deficientes en vitamina E	84
Tabla IV. 3.	Concentración de α -tocoferol en plasma de ratas controles y deficientes en vitamina E	86
Tabla IV. 4.	Concentración de γ -tocoferol en plasma de ratas controles y deficientes en vitamina E	86
Tabla IV.5.	Concentración de retinol en plasma de ratas controles y deficientes en vitamina E	88
Tabla IV.6.	Parámetros fisiopatológicos en plasma de ratas controles y deficientes en vitamina E	90
Tabla IV.7.	Niveles de α -tocoferol, glutatión y MDA en hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E	94
Tabla IV.8.	Niveles de glutatión y MDA en mitocondrias hepáticas de ratas controles y deficientes en vitamina E	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.	Estructura del glutatión, γ -glutamyl-cisteinil-glicina	6
Figura I.2.	Ciclo redox del glutatión	7
Figura I.3.	Esquema del mecanismo de activación de NF- κ B	13
Figura I.4.	Isoformas naturales de la vitamina E	19
Figura I.5.	Estabilización por resonancia del radical α -tocoferoxil	20
Figura I.6.	Mecanismo de acción antioxidante de la vitamina E	22
Figura I.7.	Biodisponibilidad de la vitamina E	31
Figura I.8.	La red antioxidante	34
Figura III.1.	Esquema de la técnica de inmunoprecipitación de factores de transcripción	78
Figura IV.1.	Concentración de α - y γ - tocoferol en ratas controles y deficientes en vitamina E	87
Figura IV.2.	Ultraestructura hepática por microscopía electrónica de ratas controles y deficientes en vitamina E	96
Figura IV.3.	Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de <i>g</i> GCS	98
Figura IV.4.	Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de <i>UCP2</i> en hígado	99
Figura IV.5.	Efecto de la deficiencia en vitamina E en la expresión de <i>UCP2</i> y <i>UCP3</i> en músculo	100

Figura IV.6.	Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de <i>ciclina D1</i> y <i>ciclina E</i>	102
Figura IV.7.	Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de <i>p21</i>	103
Figura IV.8.	Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de <i>c-jun</i>	104
Figura IV.9.	Efecto de la deficiencia en vitamina E en la actividad de unión de NF- κ B al DNA mediante análisis por EMSA	106
Figura IV.10.	Análisis de la unión <i>in vivo</i> de NF- κ B a los promotores de la γ -GCS catalítica y γ -GCS reguladora en animales controles y deficientes en vitamina E	109
Figura IV.11.	Análisis de la unión <i>in vivo</i> de AP-1 a los promotores de la γ -GCS catalítica y γ -GCS reguladora en animales controles y deficientes en vitamina E	110
Figura IV.12.	Análisis de la presencia <i>in vivo</i> de RNA-pol II en la zona transcribible de la γ -GCS catalítica y γ -GCS reguladora en animales controles y deficientes en vitamina E	112
Figura IV.13.	Análisis de la unión <i>in vivo</i> de NF- κ B al promotor de la <i>ciclina D1</i> en animales controles y deficientes en vitamina E	113
Figura V.1.	Procesos moleculares hepáticos en la deficiencia en vitamina E	128

ABREVIATURAS

α-CEHC: α-2- [2'-carboxietil] hidroxicromanol
α-TTP: Proteína transportadora de α-tocoferol
γGCS : gamma- glutamylcisteína sintetasa
γGCSC: gamma- glutamylcisteína sintetasa, subunidad catalítica (pesada)
γGCSM: gamma- glutamylcisteína sintetasa, subunidad modificadora (ligera, reguladora)
ABP: Proteína β-amiloide
AIN: Instituto Americano de Nutrición
AP- 1: Proteína activadora 1
ALT: Alanina aminotransferasa
AST: Aspartato aminotransferasa
BHT: Butilhidroxitolueno
BPDS: Ácido batofenantrolidisulfónico
BSA: Albúmina de suero bovino
BSO: Butionina sulfoximina
CDK: Quinasa ciclín-dependiente
CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CKI: Inhibidor de las quinasas ciclín-dependientes
CHES: Ácido 2-N-ciclohexamilo etanosulfónico
ChIP: Inmuprecipitación de fragmentos de cromatina
dNTP: desoxi-nucleótido tri-fosfato
DEPC: Dietil piro-carbonato
DTT: Ditiotreitól
EDTA: Ácido etilendiamino tetracético
EMSA: Ensayo de movilidad en gel
GK: Glicerol quinasa
GPO: Glicerol-P-oxidasa
GPX: Glutación Peroxidasa
GSH: Glutación reducido o γ-glutamylcisteinil-glicina
GSSG: Glutación oxidado o glutación disulfuro
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
i.p. : intraperitoneal
LDH: Lactico deshidrogenasa
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LPL: Lipoproteínlipasa

LPS: Lipopolisacárido
MDA: Malondialdehído
MDH: Málico deshidrogenasa
NAC: N- acetil cisteína
NAD⁺ : Nicotinamida adenín-dinucleótido (forma oxidada)
NADH: Nicotinamida adenin-dinucleótido (forma reducida)
NADP⁺: Nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH: Nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato (forma reducida)
NEM: N-etil-maleimida
NF-κB: Factor nuclear -κB
NRC: National Research Council
PBS: Tampón fosfato salino
PCA: Ácido perclórico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDA: Photo Diode Array
PDTC: Pirrolidina tiocarbamato
PKC: Proteín quinasa C
POD: Peroxidasa
PP₂A: Proteín fosfatasa 2A
QM: Quilomicrones
RNA pol II: RNA polimerasa II
RDA: Pautas dietéticas recomendadas
ROS: Especies reactivas del oxígeno
SDS: Dodecil sulfato sódico ó lauril sulfato sódico
SEM: Error estándar de la media
SOD: Superóxido dismutasa
TAE: Tris-ácido acético- EDTA
TAP: Proteína asociada al tocoferol
TBA: Ácido tiobarbitúrico
TBE: Tris- ácido bórico- EDTA
TNF: Factor de Necrosis Tumoral
Tris: 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
UCP: Proteína desacopladora de la fosforilación oxidativa
U.I: Unidades Internacionales
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. DAÑO OXIDATIVO CELULAR.

1.1. Estrés oxidativo inducido por radicales libres.

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Dentro de este concepto genérico, las formas parcialmente reducidas del oxígeno se denominan Especies Reactivas del Oxígeno (ROS). Es un término colectivo que incluye, no sólo los radicales del oxígeno, sino también algunos derivados reactivos no radicales del oxígeno. Además de los ROS, también son importantes en este contexto las especies reactivas del nitrógeno (RNS) (van Haaften y cols., 2003).

El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia de un incremento de la exposición a oxidantes o del descenso de la protección contra estos oxidantes; ambos problemas pueden ocurrir simultáneamente (Davies, 1999). De hecho, se define el estrés oxidativo como un desequilibrio entre la producción de ROS y la protección antioxidante (Sies, 1985; Halliwell y Gutteridge, 1989). El estrés oxidativo, provocado por cualquiera de estas causas, puede causar daño a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. De este modo, enzimas y proteínas estructurales, membranas, glúcidos simples y compuestos, DNA y RNA, son todos ellos susceptibles de daño oxidativo (Sies, 1985; Fridovich, 1995; Davies, 1999).

Los sistemas biológicos poseen varios mecanismos productores de estas especies reactivas. Dentro de los sistemas endógenos, uno de los mecanismos más importantes de producción de radicales libres es la cadena de transporte mitocondrial, concretamente en la denominada reducción monovalente o incompleta del O_2 -que representa un 3-5% del total- en la que éste va cogiendo electrones de forma secuencial, y se van generando especies reactivas.

Además de este mecanismo existen otros muchos, de origen endógeno, que forman radicales libres, como son fundamentalmente los mecanismos de acción bactericida de leucocitos y macrófagos, el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos y las reacciones del citocromo P450 (Beckman y Ames, 1998).

Entre los mecanismos procedentes de sistemas exógenos que producen radicales libres encontramos, entre otros, la biotransformación de drogas y xenobióticos, las radiaciones ionizantes de alta energía, la radiación solar, el humo de tabaco y el choque térmico.

1.2. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar los ROS ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes (Heffner y Repine, 1989; Evans y Halliwell, 2001).

La gran diversidad en la vida media de los distintos prooxidantes, desde nanosegundos para el caso del radical hidroxilo hasta varios segundos para los radicales peroxilo o el óxido nítrico y peroxinitrito pone de manifiesto la gran variedad de sistemas de defensa necesarios para hacerles frente (Sies y Stahl, 1995). Por esta razón, se han desarrollado distintas líneas de defensa biológica. Estos distintos frentes se pueden clasificar en: prevención, interceptación y reparación (Sies, 1993).

Lógicamente, la defensa contra el radical hidroxilo, altamente reactivo, sólo puede llevarse a cabo mediante prevención o reparación, ya que cualquier agente que actuase mediante interceptación necesitaría encontrarse a una concentración demasiado elevada, que sería biológicamente inaceptable simplemente por razones osmóticas. Los sistemas de defensa enzimática son extremadamente efectivos y selectivos, pero sólo son adecuados para especies reactivas del oxígeno con vida media elevada.

Dentro de la interceptación encontramos los antioxidantes que actúan por un mecanismo de rotura de cadena, en donde podemos situar a la vitamina E, que reacciona principalmente con los radicales peroxilo. El oxígeno singlete, aunque de vida media corta, puede ser neutralizado mediante extinción física (*quenching*), proceso llevado a cabo tanto por los carotenoides como por los tocoferoles (Sies y Stahl, 1995).

Además de por su mecanismo de acción, los sistemas de defensa se pueden clasificar en función de su naturaleza catalítica en enzimáticos, no enzimáticos y coadyuvantes.

Antioxidantes enzimáticos.

La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las especies del oxígeno parcialmente reducidas ($O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2) (Winston, 1990). En este grupo encontramos 3 enzimas:

Catalasa. La catalasa es una hemoproteína tetramérica cuya función es reducir el peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular y agua. Así mismo, posee actividad peroxidasa (Nohl y Hegner, 1978).

Superóxido dismutasa. Son un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno (Weiss, 1986).

Glutación peroxidasa. Complementa la actividad de la catalasa como sistema reductor del peróxido de hidrógeno. Esta enzima clave del ciclo del glutatión, actúa además sobre grandes moléculas de peróxidos lipídicos y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la lipooxigenasa.

Antioxidantes no enzimáticos.

Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la célula dispone de un conjunto de mecanismos no enzimáticos que permiten contrarrestar la agresión oxidativa que causan los radicales libres. Los sistemas antioxidantes no enzimáticos más importantes están constituidos principalmente por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995). Estos mecanismos no enzimáticos deben estar presentes en todos los compartimentos celulares y por esto algunos antioxidantes son hidrosolubles, tales como la vitamina C o el glutatión, y otros son liposolubles, tales como los β -carotenos o la vitamina E.

Vitamina C.

La vitamina C o ácido L-ascórbico es hidrosoluble, y bajo la mayoría de condiciones fisiológicas se encuentra en su forma desprotonada. Se le considera un antioxidante muy importante en fluidos extracelulares (Stocker y cols., 1991). Actúa eficientemente atrapando los radicales peroxilo en fase acuosa, antes de que éstos puedan iniciar la peroxidación lipídica; de esta forma el ácido ascórbico puede proteger a las membranas del daño peroxidativo. Además, la vitamina C puede llevar a cabo esta protección frente a la peroxidación aumentando la actividad del α -tocoferol (Sies y

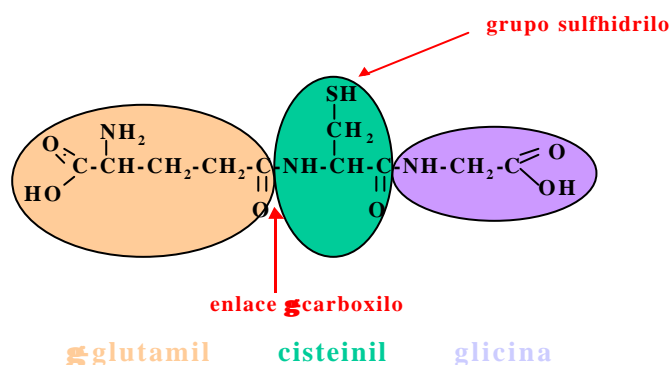
Stahl, 1995). Estudios *in vitro* muestran que el ácido ascórbico reduce el radical tocoferoxil y se recupera así la actividad neutralizadora de radicales del α -tocoferol (ver apartado 2.2.1, fig I.6 y 2.3.3, fig I.8). Aunque esta sinergia ha sido demostrada usando sistemas modelo, no se han presentado todavía evidencias directas (Sies y Stahl, 1995), si bien existen cada vez más indicios de su interrelación, como se ha observado en modelos de deficiencia cruzada de ambos nutrientes *in vivo* (Hill y cols., 2003).

Glutación.

El glutatión es un tripéptido ubicuo, γ -glutamil-cisteinil-glicina, descubierto por Hopkins en 1921. Es el tior no proteico, soluble en el citoplasma, más abundante en la célula y juega un papel central en la defensa antioxidante. La molécula de glutatión puede encontrarse en dos estados de oxidación distintos: en forma reducida, como tior (GSH) y en forma oxidada, compuesta por 2 moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG) (De Leve y Kaplowitz, 1991).

Las células eucariotas poseen tres reservorios principales para el GSH. Casi el 90% del GSH celular está en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988; Hwang y cols., 1992). Mientras que en este último compartimento la proporción GSH/GSSG es de 3:1, en el citoplasma y la mitocondria este cociente sobrepasa la proporción 10:1 (Meredith y Reed, 1982; Meister, 1988).

Figura I.1. ESTRUCTURA DEL GLUTATIÓ, γ - GLUTAMIL-CISTEINIL- GLICINA



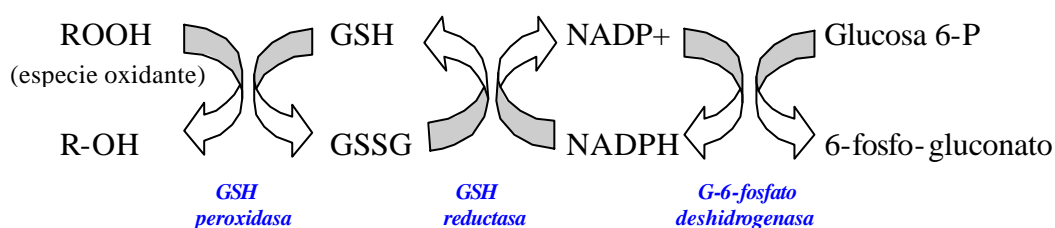
El glutamato amino-terminal y la cisteína están unidos a través del grupo γ -carboxilo del glutamato.

En la molécula de glutatión (Figura I.1), el enlace peptídico se establece entre el grupo γ -carboxilo del glutamato y el grupo α -amino de la cisteína. Este enlace atípico es el responsable de su estabilidad intracelular, ya que resiste la degradación por peptidasas intracelulares, siendo hidrolizado específicamente por la enzima γ -glutamyltranspeptidasa (Meister, 1988; De Leve y Kaplowitz, 1991).

El GSH posee varias funciones vitales incluyendo la destoxificación de electrófilos, el mantenimiento de los niveles esenciales de los tioles de las proteínas, la participación en los procesos de atrapamiento de radicales libres, reservorio de cisteína y modulador de procesos celulares críticos como son la síntesis de DNA, los procesos relacionados con los microtúbulos, y la función inmune (Viña y cols., 1986; Lu, 1999).

Centrándonos en su función antioxidante, el GSH en presencia de una GSH peroxidasa selenio-dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera endógena (Figura I.2). Como resultado de esto, el GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GSSG reductasa, a expensas del NADPH, formando así un ciclo redox.

Figura I.2. CICLO REDOX DEL GLUTATIÓN



En la mitocondria, que es un orgánulo especialmente susceptible al daño oxidativo, el GSH es particularmente importante debido a que en este compartimento no hay catalasa. Varios estudios han mostrado que el GSH mitocondrial es crítico en la defensa contra el estrés oxidativo generado tanto fisiológicamente como de forma patológica (De Leve y Kaplowitz, 1991; Fernández-Checa y cols., 1992; 1997). Se ha observado una reducción selectiva del reservorio de GSH mitocondrial en ratas alcohólicas y deficientes en vitamina A y este hecho puede jugar un papel patogénico importante en el desarrollo de alteraciones hepáticas (Fernández-Checa y cols., 1992; 1997; Barber y cols., 2000).

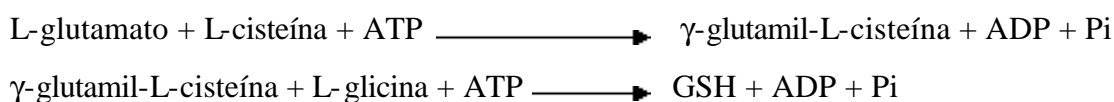
El estrés oxidativo severo puede superar la capacidad de la célula de reducir el GSSG a GSH, lo que conduce a una acumulación de GSSG en el citosol. Para proteger a la célula de un trastorno en el equilibrio redox, el GSSG puede exportarse activamente fuera de la célula o reaccionar con un grupo sulfhidrilo proteico, formándose un puente disulfuro entre estas dos moléculas. El estrés oxidativo intenso depleciona a la célula de GSH (Meister, 1988; De Leve y Kaplowitz, 1991; Fernández-Checa y cols., 1992).

Síntesis de GSH hepático.

El hígado es uno de los órganos con mayor contenido en GSH, y es único en dos aspectos de la biosíntesis de GSH; primero, el hepatocito es el único que posee la capacidad de convertir la metionina en cisteína a través de la vía de la transulfuración; segundo, la tasa de biosíntesis de glutatión en el hepatocito está condicionada por su tasa de exportación al plasma, la bilis, y la mitocondria, por distintos sistemas de transporte (Fernández-Checa y cols., 1992; Ookhtens y Kaplowitz, 1998). La importancia del GSH hepático en la homeostasis del GSH intertisular se pone de manifiesto por el hecho de que los niveles plasmáticos de GSH y cisteína son en gran medida determinados por el flujo sinusoidal del GSH hepático.

El transportador mitocondrial de GSH mantiene el reservorio de GSH en la mitocondria, que no puede sintetizar GSH (Fernández-Checa y cols., 1992; Fernández-Checa y cols., 1997). Este transportador se encuentra dañado de forma selectiva en ratas alcohólicas, colaborando en el descenso del GSH mitocondrial.

El GSH se sintetiza en el citosol de todas las células de mamífero, a través de 2 pasos enzimáticos, que requieren ATP:



La primera reacción es el paso limitante en la síntesis de GSH, y está catalizada por la γ -glutamylcisteína sintetasa (γ -GCS), también conocida como glutamato-cisteína ligasa. La segunda reacción está catalizada por la glutatión sintetasa.

Regulación de la síntesis de GSH. Control de la γ -glutamylcisteína sintetasa.

La γ -GCS está regulada fisiológicamente por los niveles de GSH –por inhibición competitiva- mediante un mecanismo de retroalimentación negativa y por la biodisponibilidad de cisteína. La γ -GCS está compuesta por 2 subunidades: una subunidad catalítica (γ -GCSC, PM ~ 73000, también llamada cadena pesada) y una subunidad reguladora o modificadora (γ -GCSM, PM ~30000, también llamada cadena ligera). Están codificadas por distintos genes, y se disocian sometidas a condiciones reductoras (Yang y cols., 2001a). La subunidad catalítica posee toda la actividad de la enzima, así como la capacidad de inhibición por retroalimentación por el GSH. La subunidad modificadora es enzimáticamente inactiva pero juega un papel regulador importante disminuyendo la K_m de la γ -GCS para el glutamato y elevando la K_i para el GSH (Huang y cols., 1993).

Los cambios en la actividad de la γ -GCS pueden ser resultado de una posible regulación a múltiples niveles, que afecten a la subunidad catalítica, a la reguladora o a ambas (Yang y cols., 2001a; 2001b). Se conocen numerosas condiciones o tratamientos que alteran los niveles del mRNA en estado estacionario de la γ -GCSC, que incluye: el estrés oxidativo, los antioxidantes, conjugados del GSH, la ingesta de etanol, tioacetamida, líneas celulares resistentes a drogas y el crecimiento relacionado con hormonas y regeneración hepática. Algunos de estos tratamientos, como es el caso del estrés oxidativo, también inducen la expresión de la γ -GCSM. Por el contrario, el crecimiento hepático rápido y la ingesta de etanol no parecen influir en la expresión hepática de γ -GCSM (Huang y cols., 2000).

Tras la clonación y caracterización de los genes de la γ -glutamylcisteína sintetasa, subunidad catalítica (Yang y cols., 2001a) y reguladora (Yang y cols., 2001b) se ha descubierto que su promotor posee sitios de unión para numerosos factores de transcripción, incluyendo NF- κ B y AP-1; si bien, hasta este momento no ha sido demostrada completamente su funcionalidad.

Vitamina A y b-carotenos.

La vitamina A (todo-*trans*-retinol) y sus derivados biológicamente activos, retinal y ácido retinoico, junto con un gran número de análogos sintéticos comprenden el grupo de compuestos denominados retinoides (Evans y Kaye, 1999; Vahlquist, 1999).

La vitamina A es esencial para la visión, la diferenciación y proliferación celular, la reproducción, el normal desarrollo neonatal y la integridad del sistema inmune.

Su naturaleza lipofílica y su localización en el compartimento hidrofóbico de las membranas biológicas y lipoproteínas hacen que la vitamina A sea un compuesto efectivo en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidor de las reacciones de oxidación en cadena. Esta propiedad antioxidante es típica del retinol más que de sus derivados, incluido el ácido retinoico; por ello, aunque muchas acciones de la vitamina A se deban a cambios en la expresión génica mediados por isómeros del ácido retinoico, estos derivados son factores improbables en la modulación del estrés oxidativo celular (Livrea y Tesoriere, 1998; Palace y cols., 1999).

Es importante señalar que el efecto antioxidante de la vitamina A se potencia en presencia de vitamina E y que este efecto es máximo en una proporción 1:10 (retinol: tocoferol), que es precisamente la relación aproximada que guardan ambos compuestos en la mayoría de las membranas biológicas. Este efecto sinérgico se atribuye no a una interacción física entre estos 2 compuestos sino a que ambos protegen desde diferentes localizaciones físicas, la vitamina E desde la parte exterior de la superficie de las membranas y la vitamina A desde el interior (Niki y cols., 1995; Palace y cols., 1999).

Vitamina E.

La vitamina E es el principal neutralizador de radicales peroxilo en medios lipídicos biológicos, como son las membranas y las lipoproteínas de baja densidad. Esta función de la vitamina E, así como otros muchos aspectos de la misma son desarrollados ampliamente en el apartado 2. VITAMINA E

Otros antioxidantes no enzimáticos.

Otros antioxidantes no enzimáticos que participan en el mantenimiento del equilibrio oxidativo son: los licopenos, el urato, la bilirrubina, los flavonoides, las proteínas plasmáticas -que fijan los metales de transición- y los antioxidantes químicos.

Sistemas secundarios o coadyuvantes.

En este grupo encontramos a la quinona óxido-reductasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenada, la glutatión-reductasa y los sistemas de reparación DNA/ Proteínas.

1.3. Estrés oxidativo y regulación génica.

1.3.1. Efecto de los radicales libres en la regulación génica.

La expresión génica está modulada tanto por señales fisiológicas (hormonas, citoquinas, etc) como por estímulos ambientales (parámetros físicos, xenobióticos, etc). El estrés oxidativo es un modulador pleiotrópico clave que puede estar envuelto en cualquiera de las 2 vías expuestas. De hecho, los ROS han sido descritos como segundos mensajeros para varios factores de crecimiento y citoquinas, pero también han sido implicados en agresiones tales como metabolismo de xenobioticos o deficiencia enzimática (Morel y Barouki, 1999).

Los ROS pueden alterar las rutas de transducción de señales así como inducir cambios en factores de transcripción que median las respuestas inmediatas al estrés celular. El mecanismo por el cual los ROS inducen cambios en las quinasas y en los factores de transcripción no está esclarecido completamente, aunque parece estar relacionado con su capacidad de alterar la conformación o la actividad de estas moléculas, así como por efectos en proteínas sensibles al estado redox ricas en cisteína (Adler y cols., 1999).

1.3.2. NF- κ B.

En 1986, Sen y Baltimore describieron un factor de transcripción nuclear en linfocitos B que se unía al dominio B del potenciador de la inmunoglobulina κ , y al que denominaron NF- κ B.

Este factor es, en realidad, un conjunto de proteínas NF- κ B / Rel, que forman una familia de factores de transcripción implicados en numerosos procesos como son la respuesta adaptativa a cambios en el balance redox celular (Mercurio y Manning, 1999), inflamación, respuesta celular inmune, regulación del ciclo celular, diferenciación y protección frente a la apoptosis (Baeuerle y Baltimore, 1996; Joyce y cols., 2001).

En mamíferos, los miembros que constituyen la familia NF- κ B / Rel son Rel-A (p65), Rel-B, c-Rel, que se forman como estructuras activas transcripcionalmente y NF- κ B₁ (p50/p105) y NF- κ B₂ (p52/p100), que son originalmente sintetizados como precursores inactivos. NF- κ B se encuentra generalmente formando dímeros de 2 de estas proteínas. El prototipo de factor de transcripción está formado por las dos

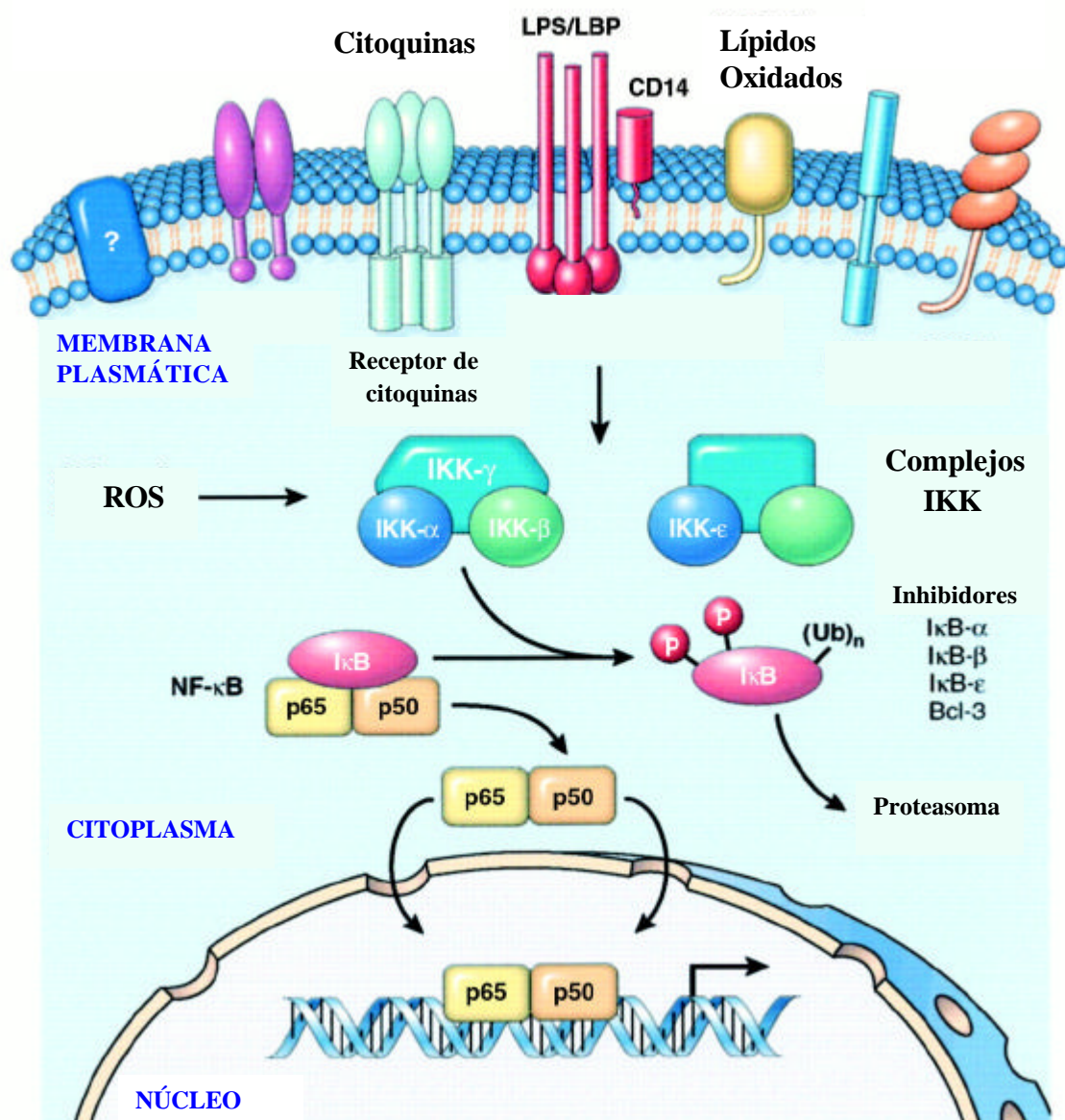
subunidades NF- κ B₁ p50 y Rel A (p65) (Mercurio y Manning, 1999). Todos los miembros de esta familia poseen una región amino-terminal conocida como dominio de homología Rel (RHD), que incluye un dominio de dimerización formado por una cremallera de leucinas, una señal de localización nuclear y un dominio de unión al DNA (Chen y cols., 1998). NF- κ B se une a motivos definidos del DNA (secuencia consenso: 5'GGGPPuNNPyPyCC-3') y provoca la transcripción de determinados genes.

En condiciones normales, en células no estimuladas, los dímeros de NF- κ B se encuentran en el citoplasma, formando complejos con unas proteínas inhibitoras de la familia I κ B. La activación de los dímeros de NF- κ B requiere la degradación de I κ B, siendo éste el principal mecanismo que controla la actividad de NF- κ B (Joyce y cols., 2001).

La familia I κ B incluye a I κ B- α e I κ B- β , ampliamente distribuidos, junto con I κ B- γ , I κ B- ϵ y Bcl-3. Estas proteínas I κ B se caracterizan por unas series repetidas de anquirinas que interaccionan con el dominio de unión al DNA y con la señal de localización nuclear de NF- κ B. Las proteínas inhibitoras I κ B- α e I κ B- β están codificadas por genes distintos, mientras que I κ B- γ surge de un ajuste (*splicing*) alternado del gen de NF- κ B₁ (Flohé y cols., 1997).

La estimulación de las células conduce a una rápida fosforilación de dos serinas llevada a cabo por un complejo con actividad quinasa (I κ B quinasa, IKK). Esta fosforilación es la señal para que se produzca la ubiquitinización de I κ B en 2 residuos de lisina y su degradación por proteólisis llevada a cabo por el proteasoma 26S.

La disociación entre I κ B y NF- κ B permite la migración del dímero NF- κ B activo al núcleo, donde puede unirse al DNA e iniciar la transcripción de determinados genes diana (Allen y Tresini, 2000) (Figura I.3). NF- κ B se activa y se transloca al núcleo en respuesta a numerosos estímulos que incluye citoquinas inflamatorias como la interleuquina -1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) así como factores de crecimiento, entre otros. La ruta iniciada por la activación de NF- κ B posee la capacidad de activar, en función del tipo celular y del estímulo al que esté siendo sometido, únicamente unos determinados genes dentro del gran repertorio de genes sensibles a NF- κ B que existen.

Figura 1.3. ESQUEMA DEL MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE NF- κ B

Adaptación de Collins y Cybulsky (2001)

Diversos agentes pueden iniciar el proceso de activación: citoquinas, lipopolisacárido (LPS), lípidos oxidados -que se unen a sus respectivos receptores-, así como los radicales libres. Estos estímulos culminan en la activación del complejo IKK, que fosforila a I κ B, que es sometido entonces a ubiquitinización y degradación proteasómica. Tras la liberación del inhibidor, los dímeros de NF- κ B se translocan al núcleo, donde se unen a genes diana y estimulan su transcripción.

NF- κ B y estrés oxidativo.

El estado redox de la célula puede controlar la activación de NF- κ B. El estrés oxidativo, incluyendo los productos de la peroxidación lipídica (Bowie y cols., 1997), o la depleción de GSH y su consecuente aumento de GSSG citosólico en respuesta al estrés oxidativo, causan una rápida ubiquitinización y fosforilación del complejo I κ B, que conduce a una activación de NF- κ B (Rahman, 2000). Así mismo, se ha observado que tanto el H₂O₂ como la radiación UV y la ionizante estimulan la degradación de I κ B. De forma recíproca, en muchos tipos celulares, los antioxidantes disminuyen o anulan completamente la activación de NF- κ B. Efectivamente, antioxidantes y reductores como el hidroxianisol butilado (BHA), N-acetilcisteína (NAC), pirrolidina ditiocarbamato (PDTC) y el α -tocoferol disminuyen la actividad de NF- κ B y su translocación. El mecanismo exacto por el cual los oxidantes y reductores influyen en la activación de NF- κ B es desconocida actualmente, aunque diferentes estudios realizados con NAC o PDTC muestran que éstos bloquean la degradación de I κ B- α inducida por determinados factores como TNF y LPS (Beg y cols., 1993; Traenckner y cols., 1994). Estos resultados apuntan a que la fosforilación y degradación de I κ B- α debe ser el paso que responde al estrés oxidativo (Li y Karin, 1999); si bien, todavía no se dispone de datos de mayor precisión molecular para elucidar este punto.

NF- κ B y ciclo celular.

NF- κ B puede actuar provocando un aumento de la cantidad de ciclina D1 y de la actividad del complejo enzimático ciclina D1 quinasa.

La ciclina D1 forma parte de una familia de proteínas que están involucradas en las etapas centrales de la regulación del ciclo celular. Las ciclinas se identifican estructuralmente porque todas ellas conservan las regiones denominadas “caja ciclina” (*cyclin-box*). Funcionan como subunidades reguladoras de unos complejos enzimáticos que forman con las quinasas ciclin-dependientes (CDK), controlando así la progresión del ciclo celular mediante puntos de control, por fosforilación e inactivación de sustratos diana (Joyce y cols., 2001).

La división celular es concebida como un recorrido a través de una serie de puntos de control (Weinberg, 1995; Sherr, 1996). El primero de éstos es el “punto de restricción” tardío en G₁, cuando la célula está irreversiblemente destinada a la síntesis

de DNA y división. La actividad de las ciclinas del grupo D -que incluye D1, D2 y D3-, la ciclina E y la ciclina A promueven el paso a través de este punto de control.

La ciclina D1 es el paso limitante para la progresión del ciclo celular en fibroblastos, condrocitos y en determinadas líneas celulares cancerígenas pero no en aquellas células que no poseen la proteína del retinoblastoma (pRB) funcional. Actúa formando un complejo enzimático con CDK4 o CDK6, conocido como ciclina D1 quinasa (Weinberg, 1995; Sherr, 1996), que es el que actúa inhibiendo la proteína del retinoblastoma mediante fosforilación, regulando así la transición de G1 a S (Kitazawa y cols., 1999).

La abundancia nuclear de ciclina D1 aumenta hasta un máximo en mitad de G1 para posteriormente descender en fase S. Tiene una vida media corta en células, siendo sometida a una rápida ubiquitinización y degradación por proteasomas. Su abundancia está controlada en gran medida por la tasa de transcripción del gen de la ciclina D1. La transcripción de dicho gen está regulada por múltiples factores de transcripción, entre ellos NF- κ B (Guttridge y cols., 1999; Hinz y cols., 1999; Joyce y cols., 1999) y AP-1 (Albanese y cols., 1995). La pérdida de control de la expresión de la ciclina D1 promueve la inestabilidad genética *in vitro* y la génesis de tumores *in vivo* (Izzo y cols., 2003).

La ciclina E alcanza su máxima abundancia nuclear al final de la fase G₁, y la actividad del complejo ciclina E/CDK2 alcanza su pico en la transición G₁/S. Al igual que la ciclina D1, la ciclina E sufre ubiquitinización y degradación proteasómica (Joyce y cols., 1999).

Los complejos CDK/ciclina están sometidos a regulación por proteínas de 2 familias conocidas como inhibidores de las quinasas ciclin-dependientes (CKI), que son las proteínas Ink4 -que actúan disociando los complejos ciclina D1/CDK4/CDK6- y la familia de las proteínas p21. Ésta última está formada por p21^{Cip1} (p21^{Waf1}) (Harper y cols., 1993), p27^{Kip1} y p57^{Kip2}. Estas proteínas actúan tanto como inhibidores de la actividad de las CDK como factores de ensamblaje. Experimentos realizados con ratones "knockout" indican que p21^{Cip1} es importante para el control del ciclo celular (Deng y cols., 1995). p21^{Cip1} inhibe la actividad quinasa de la ciclina D1 quinasa, CDK2 y Cdc2, aunque la inhibición de estas 2 últimas no se produce a todas las concentraciones, y la inhibición de ciclina D1 quinasa puede ser revertida a bajas concentraciones de p21^{Cip1}.

El papel regulador de NF- κ B en el ciclo celular y de su control sobre ciclina D1 ha sido puesto de manifiesto en investigaciones en las que usaron el "super represor" de I κ B (I κ B-SR), para inhibir la actividad de NF- κ B. I κ B-SR bloquea eficazmente el incremento de la actividad de la unión de NF- κ B al DNA inducido por suero en fibroblastos de embrión de ratón, y retrasa la entrada en fase S mientras las células están creciendo sincronizadamente (Joyce y cols., 2001).

1.4. Implicaciones del estrés oxidativo en la degeneración tisular.

1.4.1. Estrés oxidativo y enfermedad.

Los ROS han sido implicados como importantes mediadores patológicos en un gran número de trastornos clínicos (Cross y cols., 1987; van Haaster y cols., 2003); sin embargo, esta implicación no significa que estos radicales desempeñen siempre un papel directo en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, estas especies reactivas predisponen al organismo a enfermedades causadas por otros agentes. En muchos casos, el daño oxidativo es más una consecuencia del daño tisular que produce la enfermedad que una causa del mismo, y este daño oxidativo puede entonces contribuir a empeorar el daño tisular generado (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Uno de los procesos fisiopatológicos más importante en el que se ha implicado a los ROS, es el envejecimiento. Éste es un proceso multifactorial para el que se han propuesto numerosas teorías, siendo la teoría de los radicales libres una de las más consolidadas. Según esta teoría, formulada por Harman (1956) los ROS se generan continuamente en las células aeróbicas causándoles un daño que conduce a un deterioro, asociado al envejecimiento, de las funciones fisiológicas, tanto a nivel celular como del organismo. Esta teoría sugiere la posibilidad de la administración de antioxidantes para disminuir el daño asociado a la edad. Miquel y cols. (1980) postularon la teoría mitocondrial del envejecimiento celular, la cual destaca la relevancia de las mitocondrias y especialmente del DNA mitocondrial como principal blanco del daño asociado al envejecimiento (García de la Asunción y cols., 1996). Por otro lado, el incremento de la peroxidación lipídica se considera también un punto clave en la etiología y patogénesis de las enfermedades asociadas con el envejecimiento (Lippman, 1985).

Otras enfermedades que poseen un componente de daño oxidativo en su etiología o desarrollo se exponen en el apartado 2.2.3, en el que se precisa el papel de la vitamina E, propuesto por diversos autores, para contrarrestar este daño.

1.4.2. Estrés oxidativo hepático.

Los ROS han sido implicados en la patogénesis de diversas formas de enfermedad hepática. Cuando las células hepáticas son expuestas a un exceso de estas especies reactivas, se produce el daño oxidativo y se afectan muchas funciones celulares (Kaplowitz, 2000). Este proceso puede alterar la expresión de determinados genes a través de la activación de factores de transcripción como NF- κ B, que conduce a una activación de citoquinas, moléculas de adhesión, genes de supervivencia, etc., o pueden inducir alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial con consecuencias letales (Kaplowitz y Tsukamoto, 1996).

La peroxidación lipídica iniciada por los ROS puede jugar un papel importante en la fibrogénesis hepática. Esta hipótesis viene apoyada por la observación de que una suplementación dietética de vitamina E ejerce un efecto protector y paliativo en la fibrosis hepática inducida por CCl₄ (Britton y Bacon, 1994; Deulofeu y cols., 2000). Aunque el daño celular en las enfermedades hepáticas humanas es probablemente multifactorial, las especies reactivas del oxígeno juegan un papel importante en la iniciación o en el establecimiento de este daño (Britton y Bacon, 1994). El hecho de que la vitamina E posea un efecto preventivo/paliativo en este modelo así como en otros de lesión hepática, además de aportar información sobre la implicación de los ROS en el daño hepático, pone de manifiesto la importancia de mantener los niveles de vitamina E adecuados.

La regulación transcripcional es clave en la respuesta celular al estrés ambiental originado en hepatocitos por determinadas causas de daño tóxico. La diana final de las vías de señalización puestas en marcha como respuesta a una agresión hepática es frecuentemente la activación de un factor de transcripción. Entre estos factores de transcripción considerados importantes en la respuesta celular al daño se encuentra, como ya hemos dicho, NF- κ B, así como la familia de genes del *activator-protein 1* (AP-1) (*c-fos*, *c-jun*, *junB*, *junD*) y *c-myc* (Jones y Czaja, 1998). *c-Jun* es un proto-oncogen que codifica uno de los componentes del factor de transcripción AP-1, de inducción temprana por mitógenos, y ha sido implicado como regulador positivo de proliferación

celular y progresión de fase -G1 a -S. Este proceso lo lleva a cabo mediante un mecanismo que implica un control transcripcional directo sobre el gen de la ciclina D1 (Wisdom y cols., 1999). *c-jun* está sometido a regulación por un gran número de estímulos extracelulares. Por su parte, la familia de genes *c-myc* (*c-myc*, *N-myc* y *L-myc*) es un grupo importante de oncogenes nucleares. Las oncoproteínas myc actúan como factores de transcripción de secuencias específicas que regulan una variedad de genes envueltos en el crecimiento celular normal y la diferenciación. Se requiere la expresión de *c-myc* para la entrada en fase S del ciclo celular (Kanzler y Galle, 2000). El papel que la activación de AP1 y *c-myc*, inducidas por el daño hepático, juegan en la modulación del daño hepatocelular y muerte celular, así como en la proliferación es poco conocido.

2. VITAMINA E.

Los estudios genéticos y moleculares han puesto de manifiesto que la salud y la enfermedad dependen de las interacciones que se establecen entre el genotipo de una persona, su medio ambiente y su tipo de nutrición.

A pesar de la diversidad de moléculas que constituyen el cuerpo humano, únicamente se consideran esenciales para mantener el estado de salud el aporte de un pequeño número de compuestos orgánicos: ácidos grasos esenciales, colina, aminoácidos esenciales, y vitaminas, además de la energía, el agua, y los minerales suficientes (Dwyer y cols., 2002).

La carencia de vitaminas es responsable de gran número de efectos patológicos en humanos. Las deficiencias de una sola vitamina son, en la actualidad, rara vez endémicas, incluso en los países en vías de desarrollo y es más probable que se presenten como parte de los estados de desnutrición general, como consecuencia de hábitos alimentarios incorrectos, o como complicaciones de otras enfermedades como la malabsorción o el alcoholismo (Russell y cols., 2002). Sin embargo, el papel que actualmente se les está atribuyendo a las vitaminas antioxidantes en el mantenimiento del estado de salud y en la protección de enfermedades degenerativas ha puesto de manifiesto, de nuevo, la importancia de la vitamina E y del mantenimiento de sus niveles dentro del rango fisiológico.

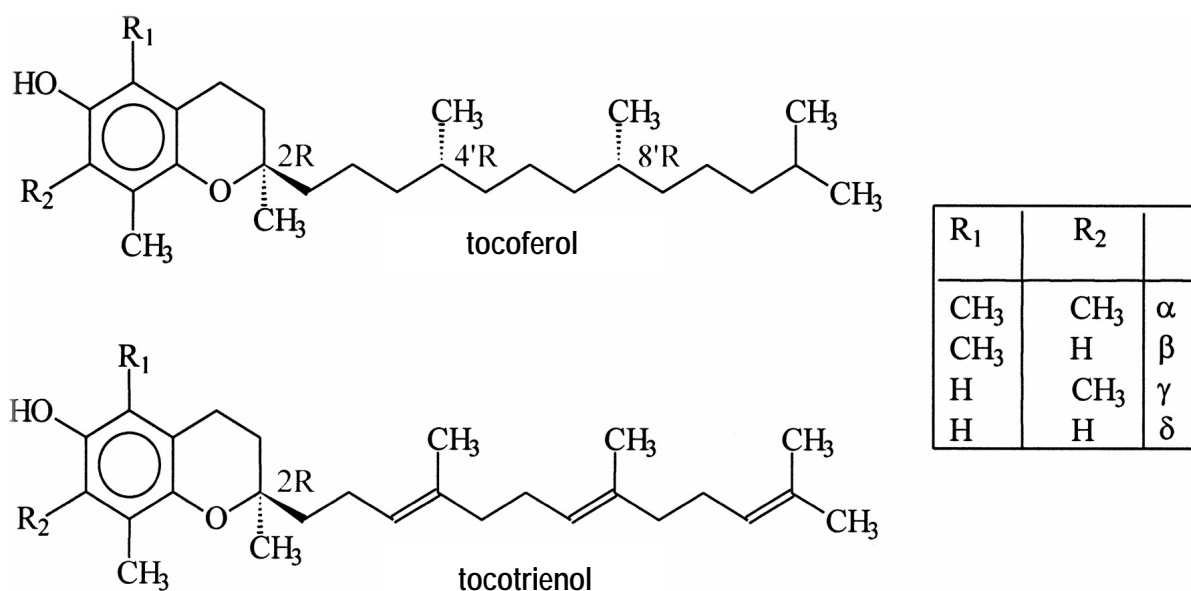
2.1. Aspectos generales de la vitamina E.

La vitamina E es un término genérico que describe a todas aquellos compuestos que cualitativamente poseen la actividad biológica del α -tocoferol. En la naturaleza se han encontrado hasta 8 sustancias que poseen la actividad de la vitamina E: α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol.

En estado puro estos compuestos son líquidos viscosos de color amarillo que se descomponen fácilmente en presencia de luz, oxígeno, pH alcalino o trazas de metales de transición. Son insolubles en agua, y fácilmente solubles en alcohol, en otros solventes orgánicos y en aceites vegetales (Ball, 1998).

La estructura del α -, β -, γ - y δ - tocoferol y sus correspondientes tocotrienoles se muestra en la figura I.4. El α -tocoferol está metilado en las posiciones C-5, C-7 y C-8 del anillo aromático. Los otros homólogos (β -, γ - y δ -) difieren en el número y las posiciones de los grupos metilo en el anillo. Los tocotrienoles difieren de sus correspondientes tocoferoles en que la cadena lateral isoprenoide está insaturada en las posiciones C-3', C-7' y C-11' (IUPAC, 1982).

Figura I.4. ISOFORMAS NATURALES DE LA VITAMINA E.

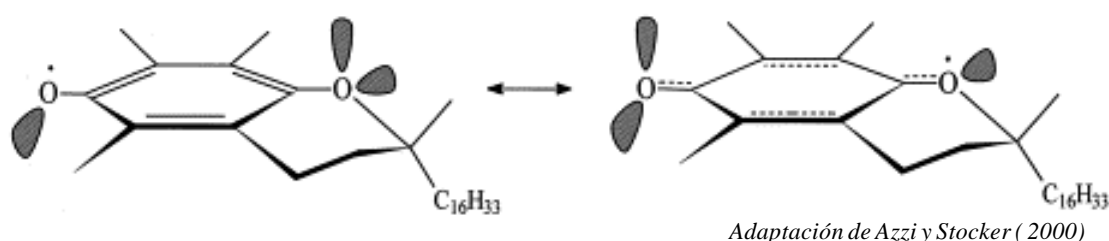


Adaptación de Azzi y Stocker (2000)

El grupo hidroxil fenólico es crítico para la actividad antioxidante de la vitamina E, ya que la donación de hidrógeno de este grupo estabiliza los radicales libres. Burton

y cols. demostraron en 1983 que el anillo heterocíclico cromanol, presente en su molécula tiene una estructura optimizada para que en estado radical –como radical tocoferoxil- el electrón desapareado se estabilice por resonancia y que los sustituyentes dadores de electrones, como son los grupos metilo, incrementan este efecto (Burton y cols., 1983) (Figura I.5).

Figura I.5. ESTABILIZACIÓN POR RESONANCIA DEL RADICAL α -TOCOFEROXIL.



La presencia de, al menos, un grupo metilo en el anillo aromático es crítica también. El α -tocoferol, con 3 grupos metilo, es el más activo, biológicamente y es el patrón de referencia frente al cual se comparan los demás (Schüep y Rettenmainer, 1984; Food and Nutrition Board, 2000).

En los tocoferoles, la cadena lateral tiene tres centros de asimetría, en C-2, C-4', y C-8'. Los tocoferoles aislados de fuentes naturales tienen la configuración R en los tres centros asimétricos, y se nombran con el prefijo 2-*R*, 4'-*R*, 8'-*R*-, o *RRR*-. Son biológicamente más activos que sus equivalentes sintéticos, que son mezclas de los ocho posibles estereoisómeros y se nombran con el prefijo *all-rac*. Los tocotrienoles tienen un centro de asimetría en C-2, además de dos posiciones de isomería geométrica en C-3', y C-7'. Los tocotrienoles naturales tienen la configuración 2-*R*, 3'-*trans*, 7'-*trans*.

La farmacopea oficial de los EEUU (USP, 1999) establece que 1 UI de vitamina E posee la actividad de 1 mg de *all-rac* α -tocoferil acetato o de 0.74 mg de *RRR*- α -tocoferil acetato. Esta definición está basada principalmente en estudios de resorción fetal realizados en ratas en los años 40. El comité de expertos de la *Food and Nutrition Board* (2000) sugiere que debe redefinirse este concepto, tomando como base lo que realmente contribuye a la forma activa de la vitamina E en humanos, esto es, los isómeros 2R (Stone y cols., 2003).

2.2. Propiedades y funciones de la vitamina E.

La vitamina E fue descubierta como un micronutriente esencial para la reproducción en ratas (Evans y Bishop, 1922); de hecho, el término tocoferol proviene del griego *tokos* = parto, *pherein*= dar a luz (la terminación -ol hace referencia al sustituyente hidroxilo de la molécula). Con el paso de los años se han ido otorgando numerosas funciones a esta vitamina, la mayoría de ellas derivadas de su capacidad antioxidante. Si bien, en los últimos años se han descrito propiedades de la vitamina E no vinculadas con esta función.

2.2.1. Función antioxidante de la vitamina E.

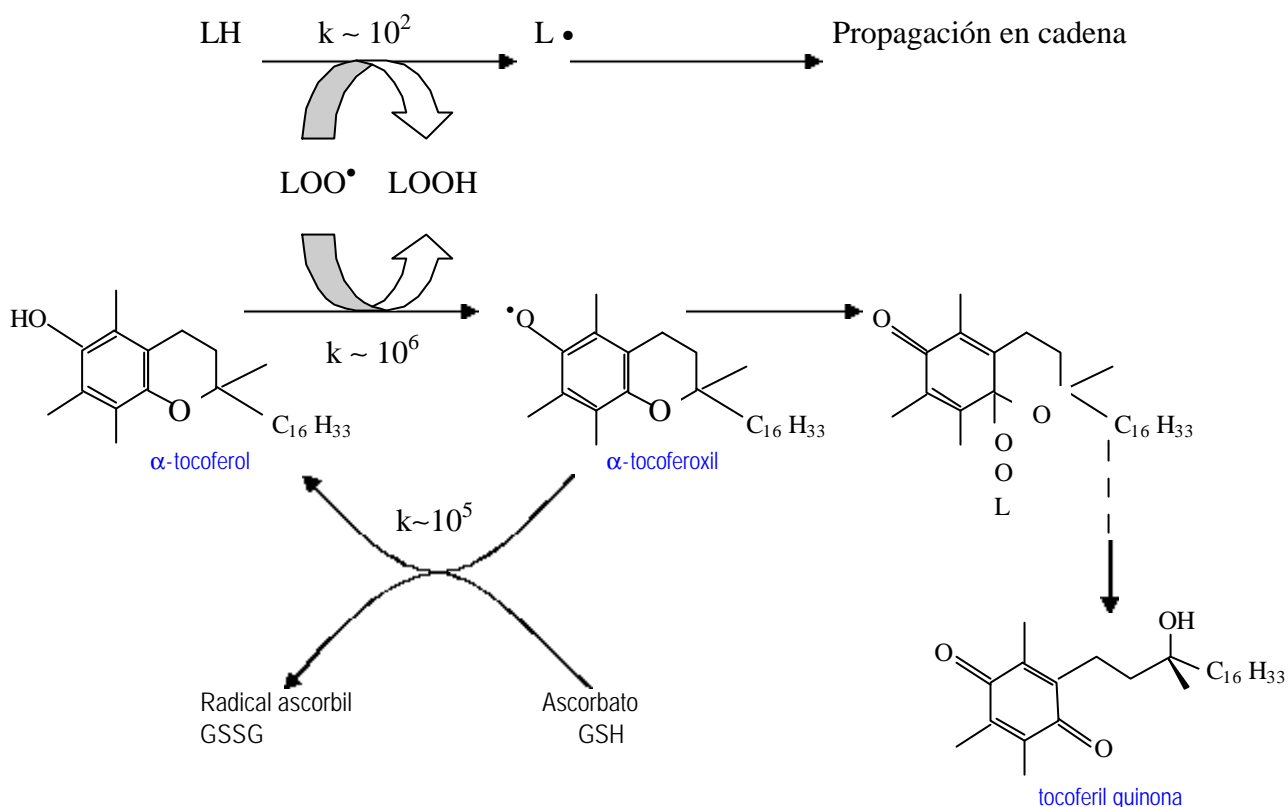
La vitamina E, debido a su hidrofobicidad, se encuentra en medio lipídico, sobre todo en lípidos de membrana y en lipoproteínas de baja densidad, y es aquí donde ejerce principalmente su acción antioxidante, como inhibidor de la peroxidación lipídica.

De hecho, la vitamina E está reconocida como el principal antioxidante en tejido graso y como la principal defensa frente a la peroxidación lipídica, ya que impide la propagación de los radicales libres (Ricciarelli y cols., 2001). De igual modo, en plasma (Burton y cols., 1982) y eritrocitos (Burton y cols., 1983), la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble que protege a los lípidos del daño peroxidativo. En lipoproteínas de baja densidad, hepatocitos, u órganos completos, el contenido de esta vitamina determina, a menudo, la susceptibilidad al daño causado por oxidantes tales como radicales hidroxilo, alcoxilo y peroxilo, entre otros (Cadenas y cols., 1984; Reed y cols., 1986).

Las reacciones mostradas en la figura I.6 son las bases propuestas por Tappel (1962) del mecanismo de acción de la vitamina E como antioxidante, protegiendo los tejidos grasos del ataque de radicales libres. Los radicales peroxilo (LOO^\bullet), pueden ser generados, por ejemplo, a partir de ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos de membrana. La vitamina E evita la propagación en cadena de los radicales peroxilo (LOO^\bullet) mediante la reducción de estos a su correspondiente hidroperóxido (LOOH). Esta reacción implica la pérdida de un átomo de hidrógeno por parte del α -tocoferol que produce la reducción de LOO^\bullet a LOOH y la formación del radical α -tocoferoxil ($\alpha\text{-T}^\bullet$), a una tasa constante de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, aproximadamente, dependiendo de la longitud de la cadena hidrocarbonada, grado de insaturación y naturaleza esterificada del ácido

graso sometido a la peroxidación (Rubbo, 2000). El radical α -tocoferoxil tiene limitada su capacidad de propagar el radical en reacciones en cadena, en la mayoría de condiciones biológicas, debido a la estabilización por resonancia del radical fenoxil y la posible reducción por ascorbato, tioles o mecanismos dependientes de enzimas.

Figura I.6. MECANISMO DE ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA E.



La constante de equilibrio, k , viene expresada $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

De esta propiedad se derivan muchos de los efectos preventivos y paliativos de la vitamina E en enfermedades como la aterosclerosis, cáncer o envejecimiento.

2.2.2. Propiedades no antioxidantes de la vitamina E.

Las propiedades de la vitamina E citadas a continuación son atribuibles principalmente al α - y γ -tocoferol, no así al β -tocoferol. Curiosamente estos tres vitameros poseen una capacidad de interceptación de radicales muy similar; por esta razón, se considera que estas funciones se deben a propiedades de la vitamina E no vinculadas con su acción antioxidante (Ricciarelli y cols., 2001). Si bien, no existen resultados concluyentes que demuestren un claro mecanismo no antioxidante.

Inhibición de la proliferación de las células vasculares.

El α -tocoferol induce una parada del crecimiento de las células vasculares del músculo liso; este efecto se ha relacionado con la capacidad del α -tocoferol de inhibir la actividad de la protein kinasa C (PKC) (Boscoboinik y cols., 1991; Tasinato y cols., 1995). Esta inhibición se produce a concentraciones fisiológicas de α -tocoferol, mientras que el β -tocoferol revierte este proceso.

La inhibición de la actividad de la PKC por el α -tocoferol no se lleva a cabo por una interacción directa α -tocoferol-proteína, sino que se produce mediante desfosforilación de la enzima, vía proteína fosfatasa 2A (PP_{2A}), que se activa por tratamiento con α -tocoferol (Ricciarelli y cols., 1998).

Regulación transcripcional.

La posible acción del α -tocoferol como regulador de la expresión génica ha sido analizada ampliamente en los últimos años (Azzi y cols., 2002). Aratri y cols. (1999) han demostrado una activación de la expresión de la α -tropomiosina por acción del α -tocoferol, pero no por el β -tocoferol, sugiriendo una vez más la implicación de un mecanismo no vinculado a la acción antioxidante de la vitamina E. Chojkier y cols. (1998) observaron tras una suplementación de α -tocoferol una inhibición del gen colágeno α -1 hepático.

Posteriormente, Azzi y cols. mediante la técnica del *differential display*, han encontrado una serie de genes cuya expresión se ve alterada por el α -tocoferol (Azzi y cols., 2000). Entre estos se encuentran los genes que codifican: el receptor recolector de clase B (CD36), la proteína transportadora de α -tocoferol (α -TTP), la α -tropomiosina, el factor de crecimiento del tejido conectivo y la collagenasa.

Sin embargo, quedan por elucidar muchos aspectos de los mecanismos moleculares a través de los cuales la vitamina E actúa como regulador de la expresión génica. Ha sido propuesto que la inhibición de la PKC llevada a cabo por el α -tocoferol podría estar involucrada en la regulación de ciertos genes (Azzi y cols., 2000; Ricciarelli y cols., 2001).

Inhibición de la adhesión celular.

El enriquecimiento en α -tocoferol de monocitos y leucocitos polimorfonucleares disminuye su adhesión, inducida por agonistas o por las LDL, a las células endoteliales humanas, tanto *in vivo* como *in vitro* (Islam y cols., 1998; Yoshida y cols., 1999). Estos procesos son relevantes en el establecimiento de la inflamación así como en las etapas tempranas de la aterogénesis.

Del mismo modo, el α -tocoferol inhibe la adhesión y la agregación plaquetaria humana, tanto *in vivo* como *in vitro*, mediante un mecanismo dependiente de la actividad PKC (Freedman y cols., 1996; Saldeen y cols., 1999). Esta propiedad también la posee, y en mayor grado, el γ -tocoferol.

Otras funciones no antioxidantes.

Además de las expuestas, han sido descritas otras propiedades de la vitamina E que no derivan de su acción antioxidante, como son el control de la biosíntesis de colesterol –mediante inhibición de la HMG-CoA reductasa–, la actividad natriurética del γ -CEHC (producto final del metabolismo del γ -tocoferol) o las propiedades estabilizantes de membrana (van Haften y cols., 2003).

Aunque no están totalmente esclarecidos los mecanismos moleculares, la inhibición de la PKC parece ser la vía común de los acontecimientos celulares regulados por el α -tocoferol no vinculados con su acción antioxidante (Ricciarelli y cols., 2001).

2.2.3. Vitamina E y enfermedad. Papel en la prevención de patologías.

De las funciones de la vitamina E descritas en el apartado anterior se derivan una serie de efectos que tienen un gran impacto en el tratamiento de enfermedades. Algunas de ellas -las más importantes desde el punto de vista social y/o clínico- están expuestas a continuación.

Enfermedades cardiovasculares.

La vitamina E tiene, potencialmente, varios efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, ya que evita la oxidación de las LDL, modula la cascada del ácido araquidónico -que reduce así la vasoconstricción y la trombosis- e inhibe la proliferación celular del músculo liso (Bramley y cols., 2000). Recientemente, se ha puesto en duda la eficacia del poder antioxidante de la vitamina E en la prevención de la oxidación de las LDL, concretamente en aquellos casos en los que se encuentra sin la presencia de otros antioxidantes, que eviten una posible acción prooxidante del α -tocoferol (Upston y cols., 2003).

Existe una gran cantidad de estudios sobre los efectos de la vitamina E en las enfermedades cardíacas, estudios que abarcan ciencia básica, estudios en animales, datos epidemiológicos y pruebas de intervención en humanos (Pryor, 2000). Se han realizado cinco grandes ensayos clínicos prospectivos y otros tres de menor escala para valorar el efecto de la suplementación de α - tocoferol en la prevención de los accidentes cardiovasculares en diferentes poblaciones (Upston y cols., 2003) (Tabla I.1). Sin entrar con detenimiento en el estudio de estas pruebas de intervención, se observa cierta discrepancia en los resultados; se comprueba que cada una de ellas tiene sus problemas inherentes y que las pruebas no son fácilmente comparables entre sí. Tomados en conjunto, los resultados son inconsistentes. Se debe considerar las principales diferencias entre estos estudios para poder llegar a una interpretación conjunta de los resultados; estas diferencias incluyen la selección de sujetos, la localización geográfica, costumbres y preferencias dietéticas de los sujetos, el estadio de la enfermedad, los puntos finales seleccionados, la dosis, modo de ingesta, y forma química en que la vitamina E es administrada (Brigelius- Flohé y cols., 2002). Además, el hecho de que no se realizase unificación de criterios, como sería la concentración plasmática de vitamina E o la determinación de parámetros de estrés oxidativo o inflamación que estableciesen las condiciones del estudio, dificulta enormemente su comparación (Devaraj y Traber, 2003).

Pese a todas estas discrepancias, la comunidad médica parece estar de acuerdo en que la vitamina E proporciona una significativa protección cardiovascular tanto en condiciones no diagnosticadas, como en las de patologías miocárdicas demostradas (Pryor, 2000).

TABLA I.1. ESTUDIOS CLÍNICOS DE SUPLEMENTACIÓN DE VITAMINA E Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.

<i>PRUEBA</i>	<i>Sujetos (x 10³)</i>	<i>Historial</i>	<i>Seguimiento (años)</i>	<i>Dosis de vit E (UI/día)</i>	<i>Resultados</i>	<i>Riesgo relativo</i>
<i>Estudios de Prevención Primaria</i>						
ATBC	29	H, fumadores	6.1	50	IM / muerte por apoplejía	0.95
PPP	4.5	Alto riesgo de CVD	3.6	448	Muerte por CVD	1.07
ASAP	0.12	H/M, col \geq 5mM	3.0	272	Progresión de IMT	0.56
VEAPS	0.35	H/M, col \geq 3.4mM	3.0	400	Progresión de IMT	1.74
<i>Estudios de Prevención Secundaria</i>						
CHAOS	2	Pacientes de CAD	1.4	800/400	Muerte por CVD	1.18
					IM no-mortal	0.23*
ATBC subgrupo	1.8	H, fumadores	5.3	50	Procesos coronarios	0.97
GISSI	1.1	Reciente IM	3.5	448	Muerte CVD, IM no mortal	0.88
HOPE	9.5	CVD	4.5	400	Muerte por CVD	1.05
SPACE	0.17	Hemodialisis + CVD	1.4	800	CVD, IM	0.46*

Upston y cols., 2003

* Efecto significativo

CAD: Enfermedad coronaria arterial; CVD: Enfermedad cardiovascular; H: Hombre; M: Mujer; IM: Infarto de miocardio; IMT: engrosamiento de la íntima/media; col: colesterol

ATBC: "***a**Tocopherol **b**Carotene study*" (Rapola y cols., 1996)

CHAOS: "*Cambridge Heart Antioxidant Study*" (Stephens y cols., 1996)

GISSI: "*Studio del Gruppo Italiano per lo Studio della Supervienza nell'Infarto miocardio*" (GISSI-Prevenzione investigators, 1999)

HOPE: "*Heart Outcomes Prevention Evaluation study*" (HOPE Study Investigators, 2000)

PPP: "*Collaborative Primary Prevention Project*" (Collaborative Group of the PPP, 2001)

Ensayos clínicos prospectivos de menor escala:

SPACE: "*Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular disease in Endstage renal disease study*" (Boaz y cols., 2000)

ASAP: "*Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention study*" (Salonen y cols., 2000)

VEAPS: "*Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study*" (Hodis y cols., 2002)

Cáncer.

Los intentos de prevenir el cáncer mediante vitamina E se basan, entre otros, en que el daño oxidativo del DNA por los radicales libres puede estar implicado en el proceso de oncogénesis (Brigelius-Flohé y cols., 2002). En este sentido, Ramírez-Tortosa y cols. (2001) han encontrado en hígados de ratas deficientes en vitamina E un incremento del daño oxidativo al DNA, estimado por los valores de 8-oxo-desoxiguanosina hepática. Este daño al DNA puede provocar mutaciones que causen alteraciones permanentes en el mensaje genético, al replicar la célula su DNA, e incrementa el riesgo de carcinogénesis.

La vitamina E previene o causa regresión de ciertos cánceres en modelos animales y sistemas de cultivos celulares (Shklar y Schwartz, 1993). Así mismo, la deficiencia en vitamina E aumenta la incidencia (Ip, 1982; Ishii y cols., 1996) y reduce la latencia (Ishii y cols., 1996) de tumores mamarios en animales de experimentación (para revisión ver Schwenke, 2002). Algunos estudios epidemiológicos también apuntan a un efecto protector de la vitamina E frente a ciertos tipos de cáncer, como son el de pecho (Schwenke, 2002), o el de próstata (Eichholzer y cols., 1996; Gann y cols., 1999). La incidencia de cáncer de colon disminuyó en varios modelos animales cuando éstos fueron suplementados con vitamina E (Prasad y Edwards-Prasad, 1992); si bien, estudios epidemiológicos en humanos resultaron menos consistentes (Stone y Papas, 1997).

Sin embargo, a pesar de todo esto, las asociaciones observadas entre ingesta de vitamina E o α -tocoferol plasmático e incidencia de cáncer han sido generalmente débiles (Bramley y cols., 2000). La principal limitación de estos estudios es su imposibilidad para controlar todos los factores asociados a la ingesta de vitamina E que pueden afectar al riesgo de cáncer de forma independiente. Por esta razón, los datos definitivos del papel de la vitamina E y riesgo de cáncer pueden ser obtenidos únicamente de pruebas de intervención a gran escala, con el suficiente tamaño de muestra, dosis, y duración del tratamiento y seguimiento.

Desórdenes neurológicos.

Los procesos oxidativos han sido implicados en una variedad de trastornos neurológicos incluyendo las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. Estas observaciones han promovido la idea de la posibilidad de que los antioxidantes puedan

tener efectos protectores en estos trastornos, bien por neutralización de los radicales libres y prevención de las reacciones de peroxidación lipídica y/o por la supresión de la activación de los factores de transcripción que están envueltos en la muerte neuronal.

La mayoría de las macromoléculas obtenidas de tejido cerebral post-mortem de pacientes con Alzheimer se encuentran en su forma oxidada (Behl, 1999). La proteína beta amiloide (ABP), encontrada en tejido cerebral post-mortem de estos pacientes, tiene un efecto tóxico directo en neuronas en cultivo, produce H_2O_2 y, posiblemente, acumulación de peroxinitritos, lo que conduce a peroxidación de membrana y, finalmente, muerte celular. El α -tocoferol protege a las neuronas en cultivo frente a la muerte celular inducida por la ABP (Behl y cols., 1992).

El estrés oxidativo también ha sido implicado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Farris y Zhang, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en su análisis no han sido claros. No se han encontrado diferencias significativas en los niveles de α -tocoferol en sangre (Fernandez-Calle y cols., 1992) u homogenados de cerebro (Dexter y cols., 1992) entre pacientes con enfermedad de Parkinson y controles.

Otras patologías.

Diabetes. Ensayos clínicos y estudios en animales muestran que el tratamiento con altas dosis de vitamina E revierte aparentemente algunos de los cambios producidos en los vasos renales y en la retina durante la diabetes (Kinlay y cols., 1999; Azzi y Stocker, 2000).

Enfermedades inflamatorias. La liberación de especies reactivas del oxígeno, incluyendo $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2 y 1O_2 es un proceso característico de la inflamación. La administración de vitamina E mitiga los síntomas asociados a varios tipos de cuadros inflamatorios agudos o crónicos, como son artritis, artritis reumatoide y osteoartritis (Bramley y cols., 2000).

Cataratas. La vitamina E ha sido correlacionada inversamente con riesgo de cataratas en 8 de 11 estudios epidemiológicos en los que ha sido considerada (Jacques, 1999).

Preeclampsia. Ha emergido la idea de que los radicales libres son los promotores de la disfunción vascular materna. Mujeres con preeclampsia tienen concentraciones plasmáticas elevadas de malondialdehído y 8-epiprostaglandina- $F_{2\alpha}$. Por todo esto, los avances en la investigación del papel de la vitamina E en la prevención de esta patología se han centrado en sus propiedades antioxidantes. En 2

estudios poblacionales en los que se examinó el efecto de la suplementación de vitamina E en mujeres con preeclampsia diagnosticada no se observaron beneficios. Sin embargo, la administración temprana de antioxidantes como la vitamina E y C a mujeres con alto riesgo de desarrollar preeclampsia tuvo un acusado beneficio clínico, encontrándose una mejor función endotelial y una menor disfunción placentaria. Estos hechos, junto con el descenso de la concentración de isoprostanos en las mujeres que recibieron suplementos vitamínicos, aportan una base bioquímica para interpretar la mejora de los síntomas clínicos (Brigelius-Flohé y cols., 2002).

Respuesta inmune. La deficiencia en vitamina E deteriora la respuesta inmune, mientras que la suplementación con dosis de vitamina E más altas de las recomendadas en la dieta, en ocasiones, mejora la inmunidad. (Meydani y Tengerdý, 1993). Esta propiedad de la vitamina E se ha relacionado también con su capacidad antitumoral.

2.3. Requerimientos nutricionales de vitamina E.

2.3.1. Biodisponibilidad de la vitamina E.

Se entiende como biodisponibilidad la proporción de vitamina E ingerida que, tras absorción intestinal, es utilizada por el organismo. Esta definición, por tanto, abarca los procesos de absorción, transporte, distribución y metabolismo de la vitamina E (Bramley y cols., 2000).

Absorción.

La absorción de la vitamina E está supeditada en gran medida a los procesos que gobiernan la digestión y absorción de las grasas de la dieta. La vitamina E se absorbe en el intestino delgado proximal, donde mediante un proceso de difusión pasiva atraviesa la vellosidades de la mucosa intestinal (Hollander y cols., 1975).

Transporte y distribución.

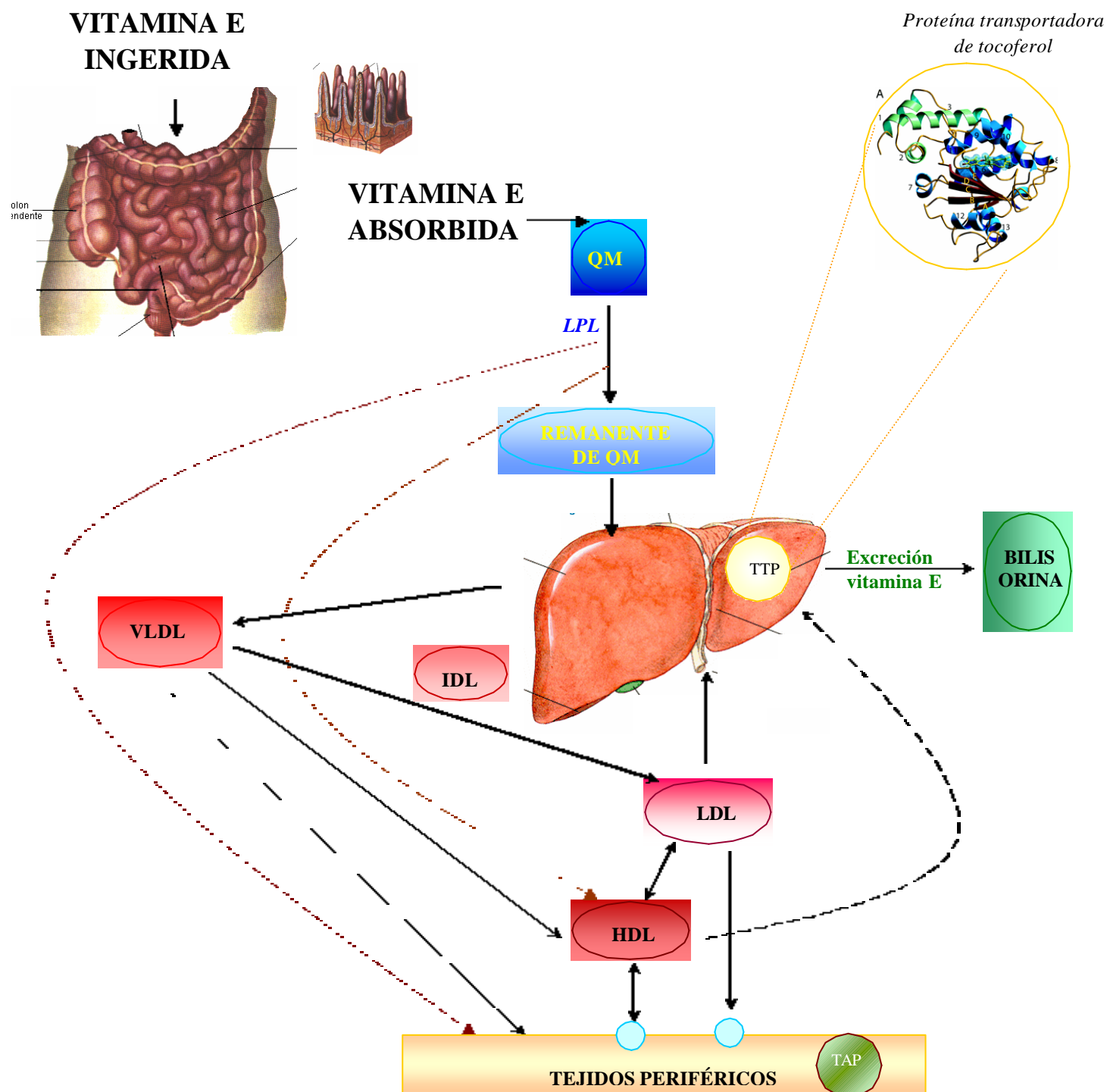
Tras la absorción de las micelas dentro de la mucosa intestinal, la vitamina E presente se empaqueta en quilomicrones (QM). Estas partículas, formadas por triglicéridos, colesterol libre y esterificado, fosfolípidos, proteínas, apolipoproteínas, vitaminas liposolubles y carotenoides, son transportadas desde el intestino, a lo largo del sistema linfático y secretados a la circulación.

La incorporación en plasma de la vitamina E es un proceso saturable (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). Sus niveles en plasma dejan de aumentar una vez alcanzada una concentración de $\sim 80 \mu\text{M}$, a pesar de aumentar las dosis por encima de los 800 mg de *RRR*- α -tocoferol/día (Schultz y cols., 1995; Jialal y cols., 1995), posiblemente debido a un reciclaje rápido del tocoferol circulante por el recién absorbido (Traber y cols., 1998). Estos datos son consistentes con los análisis cinéticos que demuestran que la fracción plasmática de α -tocoferol es íntegramente reemplazada cada día.

Los QM, ya en el torrente sanguíneo son degradados por la lipoproteínalipasa (LPL), formándose así los remanentes de QM. El resto de componentes de superficie que se obtienen tras el catabolismo de los QM, son transferidos directamente a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que son capaces de cambiar su recién adquirido tocoferol con otras lipoproteínas circulantes (Traber y cols., 1992) (Figura I.7). Además, la LPL puede actuar como una proteína de transferencia, liberando así la vitamina E hacia determinados tejidos incluyendo piel, músculo y tejido adiposo. Aquellos tejidos capaces de sintetizar LPL, como el tejido adiposo pueden obtener gran parte de su tocoferol por este mecanismo. Sin embargo, la mayor parte del tocoferol absorbido permanece en los remanentes de QM, que son entonces secuestrados por las células parenquimatosas del hígado.

El hígado juega un papel central en la liberación del tocoferol a la circulación, y consecuentemente, en su distribución a tejidos periféricos (Traber y cols., 1988; Traber y cols., 1992). Esta función depende de una proteína citosólica de 30 kD, llamada proteína transportadora del α -tocoferol (α -TTP) (Kuhlenkamp, 1993). La TTP se une preferentemente al α -tocoferol frente a su homólogo γ -, ya que puede discriminar entre el número y la posición de los grupos metilo del anillo cromanol. Además, aunque α - y γ -tocoferol son absorbidos de forma similar e incorporados en los QM en cantidades iguales, la mayoría del γ -tocoferol se secreta con la bilis, mientras que el α -tocoferol es preferentemente retenido. Esto hace que el α -tocoferol se convierta en el homólogo predominante *in vivo*, de tal forma que el 80% de la vitamina E presente en la circulación se encuentra en forma de α -tocoferol. La TTP es capaz de discriminar no sólo entre homólogos del tocoferol, sino entre diferentes estereoisómeros (Burton y cols., 1998) y esta parece ser la principal razón de que el *RRR*- α -tocoferol sea la forma mayoritaria en circulación.

Figura I.7. BIODISPONIBILIDAD DE LA VITAMINA E.



QM: quilomicrones; LPL: lipoproteína lipasa; TTP: proteína transportadora del tocoferol; LDL: lipoproteínas de baja densidad; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad; TAP: proteína asociada al tocoferol.

En el hígado, los lípidos recién absorbidos son incorporados en las nuevas lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), preferentemente enriquecidas en α -tocoferol debido a la acción de la TTP. Estas partículas son liberadas a la circulación donde son catabolizadas por la LPL. La mayor parte del remanente de VLDL (llamado lipoproteínas de densidad intermedia, IDL) regresa al hígado, convirtiéndose el resto en LDL. Los componentes de superficie que se encuentran en exceso - incluida la vitamina E- son traspasados a las HDL, y la vitamina E puede entonces transferirse, espontáneamente, desde las HDL a otras lipoproteínas (Traber, 1996).

La liberación de la vitamina E a los tejidos tiene lugar por varios mecanismos, incluidos entre ellos la transferencia directa tras el catabolismo de los QM, o bien a través de los receptores de las LDL, IDL y HDL (Traber y Kayden, 1984; Brown y Goldstein, 1986).

Una vez en el tejido, el transporte intracelular de vitamina E a través de compartimentos de membrana, está facilitado por unas “proteínas asociadas al tocoferol” (TAPs). Al igual que ocurre con la TTP, la TAP presenta una afinidad más elevada para el α -tocoferol que para el resto de formas de a vitamina E (Zimmer y cols., 2000).

Metabolismo.

La función antioxidante del tocoferol provoca su oxidación a radical tocoferoxil y, de éste, a tocoferol quinona. Aunque la primera etapa de esta reacción es reversible, la conversión en quinona no lo es. La tocoferol quinona se convierte en hidroquinona, que se conjuga con el ácido glucurónico. El glucuronato de tocoferol puede ser excretado por la bilis o degradado en el riñón formándose así el ácido tocoferónico y tocoferonolactona (Simon y cols., 1956), llamados "metabolitos de Simon", ambos con el anillo cromanol abierto. Durante décadas estos fueron los únicos metabolitos urinarios conocidos. Posteriormente se descubrieron metabolitos en los que el anillo cromanol permanecía intacto (α -CEHC, γ -CEHC, δ -CEHC). El α -CEHC aumenta cuando se excede de un cierto nivel de RRR- α -tocoferol en plasma. La estructura intacta del anillo cromanol de este metabolito indica que el α -CEHC deriva del α -tocoferol que no ha reaccionado como antioxidante, por lo que la excreción de α -CEHC podría ser un indicador de una adecuada o excesiva suplementación de α -tocoferol.

La excreción urinaria de γ -CEHC es más elevada que la de α -CEHC, lo que sugiere que prácticamente todo el γ -tocoferol ingerido es convertido y excretado como γ -CEHC.

2.3.2. Pautas dietéticas recomendadas de vitamina E.

La vitamina E es un nutriente esencial por definición, ya que no puede ser sintetizada por nuestro organismo y debe ser adquirida mediante dieta y suplementos.

Las fuentes más ricas de vitamina E en la dieta son los aceites vegetales y los productos elaborados a partir de ellos, las nueces y almendras y los cereales (Bauernfeind, 1980; Sheppard y cols., 1993). Los alimentos de origen animal, así como las frutas y verduras no son una buena fuente de vitamina E. Por todo ello, la ingesta de esta vitamina viene determinada por la ingesta de grasas (Peterson y cols., 1999). Si se considera además, la costumbre cada vez más acentuada de gran parte de la población, sobre todo de países desarrollados, de llevar a cabo una dieta baja en grasas, se concluye que esto conducirá a un impacto negativo en los niveles de ingesta de vitamina E de gran parte de la población (Parks y Traber, 2000).

Países situados en latitud norte tienen, habitualmente, los índices más elevados de muerte prematura por enfermedades crónicas tales como enfermedades coronarias o apoplejías (Bellizi y cols., 1994). Esto se atribuye, en parte, al bajo consumo habitual de alimentos ricos en micronutrientes antioxidantes (Diplock, 1994). Por ejemplo, en estos países más del 95% de la población no llega a consumir la ingesta diaria recomendada de vitamina E (Duthie y cols., 1993; Ramírez-Tortosa y cols., 2001).

Las últimas pautas dietéticas recomendadas (RDA) para la vitamina E, que fueron publicadas por el *Food and Nutrition Board (Institute of Medicine)* (National Research Council (NRC), 2000), aconsejan una dosis de 15mg (35 μ mol) /día para adultos, lo que supone un 50 % más que la ya de por sí elevada cantidad de vitamina E que para algunos autores (Horwitt, 2001), se hizo en la 10ª edición del *Recommended Dietary Allowances*, publicado en 1989 (NRC, 1989)

Desgraciadamente, ninguna de las funciones recientemente descritas de la vitamina E, como son la inhibición de la proliferación de las células del músculo liso, la inhibición de la adhesión plaquetaria y la agregación, así como la regulación de la homeostasis vascular, han sido suficientemente exploradas como para ser utilizadas como marcadores que establezcan los requerimientos (Traber, 2001). Por esta razón los

RDA actuales están basados en resultados de estudios de depleción de vitamina E, realizados por Horwitt, llevados a cabo en humanos en los años 50 y 60 en el *Elgin Hospital*, basados en la inversión de marcadores de estrés oxidativo por efecto de la vitamina E.

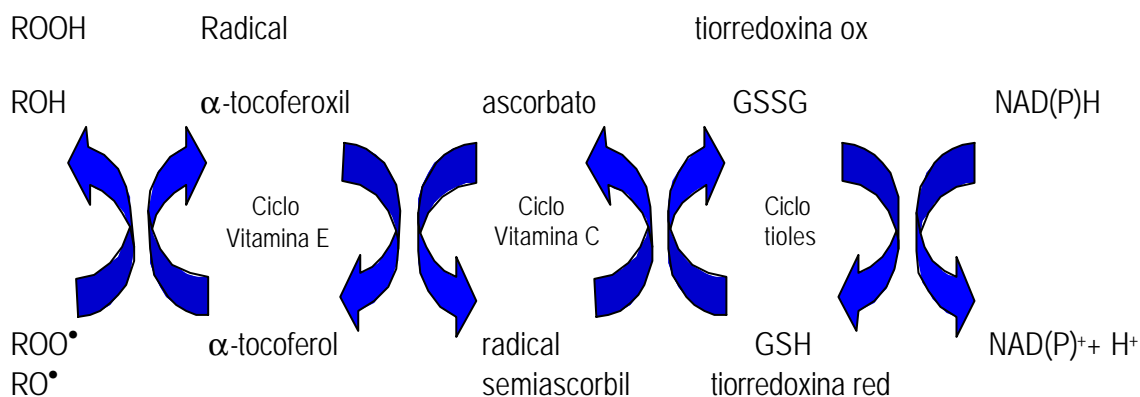
La dificultad para establecer unos niveles adecuados de vitamina E se debe, quizá en parte, al hecho de que transcurren décadas hasta que un adulto muestra síntomas neurológicos asociados a la deficiencia en vitamina E (Traber, 2001). Cabe esperar que una mayor exploración de las funciones del α -tocoferol conduzca a una mejor estimación de los requerimientos de vitamina E en humanos para prevenir enfermedades crónicas.

2.4. Suplementación de vitamina E.

Los efectos beneficiosos de dosis farmacológicas de vitamina E han sido descritos para enfermedades cardiovasculares, cáncer, inflamación crónica, Alzheimer y Parkinson. Aunque los razonamientos científicos, datos epidemiológicos y estudios retrospectivos han sido persuasivos en este sentido, las pruebas prospectivas, aleatorias, placebo-control, hasta ahora no han verificado un beneficio consistente (Brigelius-Flohé y cols., 2002).

El hecho de que los antioxidantes interactúen unos con otros en sus efectos protectores (Figura I.8) lleva a pensar que el nivel conjunto de todos los antioxidantes es el dato que debe optimizarse, más que el nivel de uno de ellos individualmente. Por todo esto se debería tener en cuenta la importancia de una suplementación basada en un grupo de antioxidantes más que el hecho de suplementar con un único antioxidante (Keaney y Frei, 1994; Pryor, 2000).

Figura I.8. LA RED ANTIOXIDANTE.



Varios autores han puesto de manifiesto un posible efecto pro-oxidante de la vitamina E provocado por la administración de dosis demasiado elevadas, especialmente si este hecho es concomitante con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Halliwell, 2000; Eder y cols., 2002).

Toxicidad de la vitamina E.

Existe un consenso entre expertos de que la vitamina E es segura a niveles por encima de las 800 UI / día y probablemente esta afirmación sea válida para valores de hasta 1600 UI /día (Bendich y Machlin, 1988; Kappus y Diplock, 1992). Se han llevado a cabo ensayos clínicos en los que se administraban dosis entre 200-2400 UI/ día durante periodos de más de medio año y los sujetos no sufrieron efectos adversos (Bendich y Machlin, 1993). Únicamente se ha observado algún efecto colateral, como puede ser malestar gastrointestinal, creatinuria, deterioro en la coagulación, todos ellos de escasa severidad, con dosis superiores a 3000 mg/día (Kappus y Diplock, 1992). En cualquier caso se recomienda no exceder de una pauta diaria de 1000 mg de RRR- α -tocoferol.

Pese a toda esta inocuidad manifiesta, la suplementación con vitamina E se desaprueba en las 2 semanas anteriores y posteriores de una intervención quirúrgica y en aquellos individuos que reciben terapia anticoagulante -incluyendo a aquellos consumidores habituales de aspirina-, ya que se produce una reducción de la adhesión plaquetaria (Machlin, 1989; Horwitt, 2001).

2.5. Deficiencia en vitamina E.

2.5.1. Etiología. Enfermedades que cursan con deficiencia en vitamina E.

La deficiencia severa en vitamina E raramente ocurre en humanos como consecuencia de una deficiencia dietética. Sin embargo, esta deficiencia puede producirse como resultado de anomalías genéticas en la α -TTP y como resultado de determinados síndromes de malabsorción (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). Además de estas alteraciones que cursan con deficiencia en vitamina E, algunas de ellas descritas a continuación, conviene destacar que el incremento de población envejecida, cuyos requerimientos antioxidantes son más elevados (Johnson y cols., 2002), así como

la tendencia actual a consumir dietas bajas en grasas (Peterson, 1999) conlleva que gran parte de la población no llegue a consumir los requerimientos mínimos de vitamina E.

Abetalipoproteinemia.

La abetalipoproteinemia es un trastorno genético que cursa con malabsorción de lípidos. Los pacientes que la padecen sufren importantes anormalidades neurológicas, como son una progresiva neuropatía periférica y ataxia espinocerebelar (Kayden, 1993). En los primeros años de estudio, esta enfermedad era diagnosticada como ataxia de Friedreich. El análisis del plasma de estos pacientes muestra generalmente una ausencia virtual de α -tocoferol. Ya en 1965, Kayden y Silber propusieron que las anormalidades neurológicas en pacientes con abetalipoproteinemia eran debidas a la deficiencia en vitamina E. Afortunadamente, una suplementación oral de vitamina E en grandes cantidades -debido a la extremadamente limitada absorción- produce una mejora en el desorden neurológico y una interrupción en la progresión de las manifestaciones.

Ataxia con deficiencia en vitamina E (AVED).

Es una enfermedad autosómica recesiva, en la que hay un defecto genético en la proteína transportadora de α -tocoferol (α -TTP) (Traber y Arai, 1999). Esta enfermedad, antes denominada deficiencia en vitamina E aislada familiar (FIVE), cursa con anormalidades neurológicas muy similares a las de la ataxia de Friedreich y que son características de los desórdenes neurológicos asociados con la deficiencia de vitamina E en humanos (Sokol, 1993). A diferencia de estos pacientes, los enfermos de ataxia de Friedreich mantienen niveles normales de α -tocoferol en plasma y, por tanto, se recomienda que este parámetro sea medido en todos aquellos pacientes con ataxia y neuropatía para evitar un posible error de diagnóstico.

Fibrosis quística.

A diferencia de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, la fibrosis quística no es una enfermedad que pueda ser prevenida o tratada con vitamina E. Sin embargo, debido a la malabsorción de lípidos que se produce en este desorden, los pacientes con fibrosis quística muestran frecuentemente deficiencia en vitamina E (Cynamon y cols., 1988; Brigelius-Flohé y cols., 2002). De este modo, la

suplementación con vitamina E se ha convertido en parte de la terapia de rutina. La dosis recomendada para adultos es de 200-400 UI/día, sin especificación de la forma.

Colestasis hepática.

Los enfermos de colestasis hepática sufren una falta de secreción biliar en el intestino que provoca esteatorrea, malabsorción lipídica y por tanto, malabsorción de vitaminas liposolubles (A, D, E, K) con su subsiguiente deficiencia (Francavilla y cols., 2003). En estos pacientes, las anormalidades neurológicas se desarrollan más rápidamente que en la abetalipoproteinemia. El tratamiento con formas ordinarias de vitamina E liposoluble resulta inefectivo debido a la malabsorción lipídica. Sin embargo, un derivado hidrosoluble, *d*- α -tocoferil polietilen glicol 1000 succinato, eleva los niveles de α -tocoferol en plasma y tejidos y mejora los síntomas neurológicos (Sokol y cols., 1993).

Alcoholismo y otras patologías hepáticas.

Estudios epidemiológicos muestran un descenso en los niveles séricos de vitamina E en pacientes alcohólicos (Tanner y cols., 1986; von Herbay y cols., 1994) y con patologías hepáticas tales como cirrosis (Look y cols., 1999), fibrosis y fibrogénesis hepática (Kim y cols., 2000), hepatocarcinogénesis (Wu y cols., 1997) y en general alteraciones hepatobiliares (Shirahata, 1999), comparados con un grupo de población sana. Del mismo modo, estudios experimentales en ratas han demostrado que el tratamiento crónico con etanol reduce drásticamente el contenido de vitamina E en el hígado de estas ratas (Koch y cols., 2000; Kanbagli y cols., 2002).

Las causas del descenso de vitamina E en estas patologías no están esclarecidas al día de hoy, aunque Wu y cols (1997) han observado que, en el perfil de expresión génica característico de la hepatocarcinogénesis, se encontraba disminuida la expresión de la α -TTP, lo que podría explicar, en parte, los bajos niveles de vitamina E encontrados en estos pacientes. Este descenso de vitamina E va acompañado de un incremento de la peroxidación lipídica en estos pacientes, y apunta al papel crucial que los ROS juegan en la iniciación y/o establecimiento del daño hepático (Kaplowitz, 2000).

Otras patologías.

Otras situaciones en las que se produce deficiencia en vitamina E son en los pacientes con nutrición parenteral total, en la anemia hemolítica y en los niños prematuros (Brigelius-Flohé y cols., 2002).

2.5.2. Efectos de la deficiencia en vitamina E.

En el apartado 2.2.3 se ha realizado una descripción de la relación entre vitamina E y diversas patologías. Estos datos se han obtenido fundamentalmente de estudios epidemiológicos retrospectivos, así como de modelos de administración de vitamina E. Sin embargo, los estudios sobre los efectos que causa la deficiencia son muy escasos e incompletos.

En general, las deficiencias vitamínicas en humanos cursan con 3 estados progresivos: un primer estadio, en el que al no existir un aporte vitamínico exterior, se van consumiendo las reservas vitamínicas del organismo. En una segunda fase, de subcarencia subclínica, no se aprecia una alteración de las funciones, pero los depósitos del organismo han disminuido y aunque no existen lesiones aparentes, las pruebas bioquímicas ya no son normales. En una última fase se produce la manifestación de signos clínicos de carencia, que aunque varía mucho de unas carencias vitamínicas a otras, puede tardar en manifestarse hasta 6 meses, y de no tratarse podrían producirse lesiones celulares irreversibles.

La deficiencia en vitamina E no produce una enfermedad de rápido desarrollo de síntomas como las producidas por otro tipo de deficiencias vitamínicas: escorbuto, beriberi, pelagra, raquitismo o xeroftalmia. Los efectos de una inadecuada ingesta de vitamina E generalmente se desarrollan a largo plazo, normalmente décadas, y se han asociado con enfermedades degenerativas como el cáncer, Alzheimer, Parkinson, aterosclerosis, y otras enfermedades cardiovasculares. La vitamina E es particularmente importante en tejidos que contengan altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, como son el cerebro y el sistema nervioso central (Farris y Zhang, 2003).

De forma general, la bibliografía médica describe el síndrome de deficiencia en vitamina E mediante los siguientes síntomas: arreflexia, trastornos de la marcha, disminución de la sensibilidad propioceptiva y vibratoria y paresia en la mirada, que se asocian a una degeneración de los haces posteriores de la médula espinal y pérdida selectiva de los axones mielinizados de gran calibre de los nervios periféricos (Sokol, 1988; Russell y cols., 2002). La deficiencia en vitamina E produce parálisis muscular y

cambios degenerativos en el sistema nervioso central y periférico, así como cambios necróticos en el músculo esquelético, cardíaco y liso (Enrione y cols., 1999). Se han observado disfunciones neurológicas en adultos sometidos a una prolongada deficiencia en vitamina E causada por una malabsorción lipídica (Machlin, 1989).

A nivel pulmonar se ha encontrado que la deficiencia en vitamina E sensibiliza las células alveolares tipo II para la apoptosis. La depleción en vitamina E provoca efectos pronunciados en elementos de la vía apoptótica intrínseca, mediada por mitocondria, en este tipo celular (Sinha y cols., 2002). Otro tejido en el que se ha estudiado el efecto de la deficiencia en vitamina E es el riñón, en el que se ha visto que la deficiencia en vitamina E asociada a una depleción de glutatión, provoca una respuesta regenerativa (Yano y cols., 1998).

Deficiencia en vitamina E en el hígado.

Ante un estado sistémico de deficiencia en vitamina E el hígado es un órgano que se depleciona de esta vitamina mucho más rápido que otros tejidos, como los testículos o glándulas suprarrenales (Burzcinisky y cols., 2001); pero curiosamente, a pesar de ello, no es el órgano que resulta más afectado en esta situación de carencia nutricional. Como ya hemos dicho, varios autores han confirmado que el tejido neuronal y el músculo esquelético son los más vulnerables al daño oxidativo producido por depleción de vitamina E, mientras que la morfología del hígado y la función mitocondrial hepática no parecen afectarse en ratas sometidas a una deficiencia crónica de vitamina E (Kayden, 1993; Thomas y cols, 1993; Ito y cols., 1997; Rafique y cols., 2001; Yokota y cols., 2001). Sin embargo, la falta de alteraciones en la morfología del hígado y en la función mitocondrial hepática no implica que no tengan lugar otras manifestaciones relacionadas con el estrés oxidativo, teniendo en cuenta, además, que en la actualidad los procesos moleculares y la respuesta génica que se produce en el hígado debido a la depleción de vitamina E son muy poco conocidos.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La vitamina E es un nutriente esencial que actualmente está recibiendo una considerable atención pública. Sus potentes propiedades antioxidantes -principalmente como inhibidor de la peroxidación lipídica- han puesto de manifiesto su importancia en la prevención y tratamiento de enfermedades en las que el estrés oxidativo interviene como componente destacado en su etiología o desarrollo; entre ellas se encuentran alteraciones tan importantes en la actualidad como son los trastornos cardiovasculares, cáncer, inflamación crónica y trastornos neurodegenerativos. A pesar de este creciente interés, gran parte de la población, sobre todo en países desarrollados, no llega a consumir los requerimientos mínimos de vitamina E, entre otras causas por el incremento de requerimientos nutricionales antioxidantes de una población envejecida, y por la tendencia al consumo de dietas bajas en grasas.

En la bibliografía podemos encontrar numerosos estudios epidemiológicos -prospectivos y retrospectivos- de los efectos de la vitamina E en enfermedades humanas, sin resultados concluyentes en la mayoría de los casos. En ciencia básica, numerosos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la acción antioxidante de la vitamina E. Sin embargo, los estudios *in vivo* son escasos e incompletos, y se han centrado más en la suplementación que en la deficiencia. A pesar de que numerosos trastornos hepáticos cursan con deficiencia en vitamina E, la mayoría de modelos de deficiencia *in vivo* han basado su estudio en tejidos como el sistema nervioso central y el músculo, cuya afectación es aparentemente la responsable de gran parte de la sintomatología de la deficiencia, mientras que el hígado ha sido relativamente poco estudiado, desconociéndose en gran medida los procesos moleculares que tienen lugar en este tejido como consecuencia de la depleción de vitamina E.

Con estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Establecer un modelo *in vivo* de deficiencia crónica en vitamina E.
2. Determinar el grado de estrés oxidativo hepático que produce la deficiencia en vitamina E.

Objetivos

3. Analizar la expresión de genes sensibles al estado redox de la célula, como respuesta a la depleción hepática de vitamina E.
4. Estudiar si NF- κ B, factor de transcripción sensible al estado redox celular, se encuentra activado en este modelo de estrés oxidativo hepático.
5. Determinar la posible participación de NF- κ B en la regulación de los genes estudiados en el hígado de ratas deficientes en vitamina E.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL y MÉTODOS

MATERIAL.

1. PRODUCTOS Y REACTIVOS.

Todos los productos químicos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA), Boehringer Mannheim (Alemania), y Panreac (España) en grado de pureza analítico. La dieta administrada a los animales de experimentación fue suministrada por ICN-Biomedicals, Bélgica (ICN-Biomedical, Cleveland, Ohio, USA). Para la determinación de triacilglicerolos, colesterol, creatín-fosfo-quinasa y aminotransferasas se utilizaron métodos enzimáticos suministrados por Spinreact, S.A.(España). El pentotal sódico fue obtenido de laboratorios Abbot.

2. APARATOS E INSTRUMENTAL.

-*Centrífugas*. Las centrifugaciones a baja velocidad se realizaron en las centrífugas Sorvall MC 12V, Heraeus Sepatech Labofuge 200 y centrífuga refrigerada Heraeus Spatech Labofuge 400R. Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en la centrífuga Heraeus Instrument Biofuge 13 y en la ultracentrífuga refrigerada Beckman Coulter, Optima™ Max.

-*Espectrofotómetros*. Shimadzu UV-160 -para la determinación de cinéticas enzimáticas y cuantificación de RNA-; Pharmacia Biotech: Ultrospect 2000.

- *Ultramicrotomo*. LK20

- *Microscopio electrónico de transmisión*. Philips C100

-*Balanzas*. Balanza AND electronic balance FA-2000, balanza de precisión Sartorius BP 210 S.

-*Homogeneizador*. Potter-Elvehjem RW, 20DMZ Janke & Kunker (Ika-Werk), utilizando para su uso émbolos de teflón de distintos tamaños; Ultraturrax T25 basic Ika Labortechnik.

-*Sonicador*. Branson Sonifier 150.

-*Estación de vacío*. Eppendorf modelo Concentrator 5301 .

-*Bomba de vacío.* Utilizamos una bomba de vacío Millipore, para el filtrado de los solventes que componen las fases móviles del HPLC. Se utilizaron filtros de 0.45µm de diámetro de poro, de di-fluoro de polivinilideno modificado (Durapore hidrófila®) para solventes acuosos y de politetrafluoruro de etileno unido a polietileno (Fluoropore®) para solventes orgánicos. Tanto el equipo de filtración como los filtros fueron de la marca Millipore.

-*Equipos para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).* El instrumental que forma el sistema de HPLC consiste en: 2 bombas Waters, modelo 515; inyector manual Waters, modelo 2157; detector Waters 996 Photodiode Array modelo 441; impresora Epson FX600; sistema computerizado para el procesamiento de datos mediante el programa Millenium³²; columna Nova-Pack C₁₈(Waters) para la determinación de tocoferoles, retinol y MDA; columna Spherisorb aminada, de dimensiones 20 x 0.46cm y 5µm de diámetro de partícula para la determinación de GSSG.

-*Termociclador.* Gene Amp PCR Biosystems 2400 (Applied Biosystems).

-*Cámara UV y sistema informático acoplado.* Transiluminador UV, conectado con el programa informático “Gene Snap” y “Gene Tools” del sistema de documentación de geles Syn Gene®.

-*Otros.* pH-metro Crison, modelo GLP21; baño termostatzado, rotores, agitadores, micropipetas Gilson, arcones a -20°C y -80°C para almacenamiento de muestras, jeringas Hamilton de diversas capacidades, jaulas, material de vidrio usual en todo laboratorio, material de plástico desechable, material quirúrgico...

3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Los animales fueron cuidados y tratados de acuerdo con los criterios establecidos en la “Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio”, realizada por la *National Academy of Sciences* y publicada por el *National Institute of Health* (National Research Council, 1985).

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ratas macho de la raza Wistar que se dividieron en dos grupos experimentales: animales control y animales deficientes en vitamina E. Cada grupo se subdividió en dos, en función del tiempo de tratamiento, 60 o 90 días, estableciendo así, en el grupo de animales deficientes en vitamina E, dos grados de deficiencia (concentración de tocoferol en plasma < 10% y <

3% que sus respectivos controles, según edad). La deficiencia en vitamina E se consiguió mediante la administración de una dieta exenta de vitamina E, tal como se detalla a continuación en la sección de Métodos. 1. Tratamiento dietético de los animales.

4. DIETAS AIN-93G.

La dieta es, quizás, el factor más importante en nutrición experimental (Reeves, 1997). Los distintos tipos manufacturados de dieta animal son: dietas no purificadas (proviene de fuentes naturales mixtas), dietas purificadas (proviene de ingredientes refinados, por ejemplo proteínas aisladas tipo caseína) o dietas químicamente definidas (elaboradas con ingredientes químicamente puros, como serían aminoácidos aislados). En nutrición experimental animal las dietas más utilizadas y recomendables son las purificadas o las definidas químicamente, ya que el conocimiento y el control preciso de los componentes de la dieta son imprescindibles para el establecimiento del mecanismo particular de un nutriente.

En 1977 y 1980 el *American Institute of Nutrition* (AIN) publicó la formulación de una dieta purificada para roedores que designó como AIN-76 A, cumpliendo o incluso sobrepasando los requerimientos nutricionales dados por el National Research Council (National Research Council, 1978). En 1993, tras numerosos estudios, la formulación fue revisada y actualizada a la hoy conocida como AIN-93G (Tabla III.1), con una mejora del balance de nutrientes esenciales para estudios en experimentación animal a corto y largo plazo. En la nueva composición, la cantidad de vitamina E (α -tocoferol) se incrementó con respecto a la contenida en la dieta AIN-76 A (Reeves y cols., 1993; National Research Council, 1995; Reeves, 1997). La dieta AIN-93 G está formulada específicamente para el crecimiento, preñez y lactancia de roedores.

La Tabla III.1 describe la composición específica de la dieta sólida AIN-93G utilizada en la alimentación de los animales control. Los animales del grupo deficiente fueron alimentados con la misma dieta pero exenta de vitamina E.

TABLA III.1. COMPOSICIÓN DE LA DIETA AIN-93G.

Componentes	g / Kg de dieta
Almidón de maíz	397.5
Caseína (exenta de vitaminas)	200.0
Dextrina de maíz	132.0
Sacarosa	100.0
Aceite de soja	70.0
Celulosa	50.0
Mezcla de minerales AIN-93G-MX * ¹	35.0
Mezcla de vitaminas AIN-93-VX * ²	10.0
L-cistina	3.0
Bitartrato de colina	2.5
<i>tert</i> -butil hidroquinona	0.014

<i>*1 Mezcla de minerales AIN-93G-MX</i>	<i>Composición por Kg de mezcla</i>
Carbonato cálcico anhidro	357.00 g
Fosfato potásico monobásico	196.00 g
Citrato potásico (tripotásico, monohidratado)	70.78 g
Cloruro sódico	74.00 g
Sulfato potásico	46.60 g
Óxido de magnesio	24.00 g
Citrato férrico	6.06 g
Carbonato de zinc	1.65 g
Meta-silicato sódico. 9 H ₂ O	1.45 g
Carbonato de manganeso	0.63 g
Carbonato cúprico	0.30 g
Sulfato de cromo y potasio.12 H ₂ O	0.28 g
Ácido bórico	81.50 mg
Fluoruro de sodio	63.50 mg
Carbonato de níquel	31.80 mg
Cloruro de litio	17.40 mg
Selenato de sodio anhidro	10.25 mg
Yodato potásico	10.00 mg
Paramolibdato amónico.4H ₂ O	7.95 mg
Vanadato amónico	6.60 mg
Sacarosa en polvo	221.02 g

<i>*2 Mezcla de vitaminas AIN-93-VX</i>	<i>Composición por Kg de mezcla</i>
Niacina	3.00 g
Pantotenato cálcico	1.60 g
Piridoxina HCl	0.70 g
Tiamina HCl	0.60 g
Riboflavina	0.60 g
Ácido fólico	0.20 g
Biotina	0.02 g
Vitamina B ₁₂	2.50 g
α -Tocoferol (250 U/g)	30.00 g
Palmitato de vitamina A (250.000 U/g)	1.60 g
Vitamina D ₃ (400.000 U/g)	0.25 g
Menadiona	0.08 g
Sacarosa en polvo	958.85g

MÉTODOS.

1. TRATAMIENTO DIETÉTICO DE LOS ANIMALES.

La deficiencia en vitamina E se consiguió mediante la administración de una dieta exenta de vitamina E, como se describe a continuación. Ratas preñadas proporcionadas por Charles River (Barcelona, España) se alojaron en jaulas individuales en nuestro propio estabulario a temperatura ambiente entre 20-22 ° C con un ciclo de 12 h luz-oscuridad (08:00-22:00). Tras el nacimiento, las madres con sus correspondientes camadas se dividieron en dos grupos:

Control. Madres alimentadas con una dieta completa proporcionada por ICN [AIN-93G (ver apartado anterior Tabla III. 1), siguiendo las recomendaciones dadas por el *American Institute of Nutrition* (Reeves, 1997; Reeves y cols., 1993)].

Deficiente en vitamina E Madres alimentadas con dieta AIN-93G, exenta de vitamina E. El paso de la vitamina E desde la placenta a la circulación del feto es un proceso poco eficiente, pero su requerimiento durante el desarrollo fetal está bien establecido (Leger y cols., 1998; Brigelius-Flohé y cols., 2002). Por ello, basándonos en un modelo previo de deficiencia en vitamina A (Estornell y cols., 1997; Barber y cols., 2000), hemos establecido el inicio de la deficiencia en las madres lactantes desde el día del parto, evitando efectos perjudiciales de la deficiencia en el desarrollo fetal y favoreciendo la deficiencia de esta vitamina ya que deja de administrarse durante la lactancia, acortando por tanto el periodo de inducción de deficiencia en las crías. Hemos comprobado que esta medida no modifica la producción de leche materna ni el crecimiento normal de las crías (ver sección IV. Resultados. 1.1. Producción de leche durante la deficiencia en vitamina E).

A los 21 días de edad se destetaron las crías macho de cada grupo y se alimentaron con su correspondiente dieta materna: completa, en el caso del grupo de animales control, o deficiente en vitamina E para el grupo de animales deficientes en vitamina E, hasta los 60 o 90 días de edad. Este periodo de tiempo fue elegido ya que es suficiente para inducir en el grupo deficiente una notable depleción de los niveles plasmáticos y hepáticos de vitamina E sin aparentes signos clínicos de deficiencia ni retraso en el crecimiento.

2. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Los experimentos fueron realizados siempre entre las 10:00-12:00 a.m., para evitar variaciones debidas al ritmo circadiano. Los animales se anestesiaron con pentotal sódico (50 mg / kg peso, vía i.p.). La sangre se obtuvo por punción en la aorta abdominal utilizando jeringas heparinizadas previamente; a continuación, se extrajo rápidamente el hígado. Una parte del mismo se congeló por presión entre dos piezas de aluminio previamente enfriadas en nitrógeno líquido (técnica de "freeze-clamping", Wollemberger y cols., 1960) y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento, para extracción de RNA. De esta forma la delgada capa de tejido se congela en fracciones de segundo. El resto del hígado se utilizó fresco para la obtención de mitocondrias aisladas, la fijación en paraformaldehído/ glutaraldehído en tampón cacodilato para la realización posterior de microscopía electrónica y la fijación en formaldehído para la realización del *ChIP assay*.

3. DETERMINACIÓN DEL INCREMENTO DEL PESO DE LAS CRÍAS Y DE LA PRODUCCIÓN DE LECHE MATERNA.

La determinación de la producción de leche materna en los dos grupos experimentales se realizó según el método descrito por Sampson y Jansen en 1984. Para ello se pesaron todas sus crías conjuntamente los días 13 y 14 de la lactancia (pico de lactancia) a la misma hora (10:00 - 12:00 a.m.) y con la misma balanza. El método de determinación de producción de leche materna se basa en la determinación del incremento de peso de un número determinado de crías en un periodo de 24 horas y en condiciones normales de amamantamiento de las crías por su madre.

La ecuación que relaciona la producción de leche materna en $\text{mL} \cdot \text{cría}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ con el peso medio de una cría en gramos y con el incremento medio de peso en 24 h de una cría en gramos es la siguiente:

$$\text{Producción de leche (mL . cría}^{-1} \cdot \text{día}^{-1} \text{)} = 0.0322 + [0.0667 \cdot \text{peso cría (g)}] + [0.877 \cdot \text{incremento de peso (g)}]$$

4. OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS AISLADAS DE HÍGADO.

Para el aislamiento de mitocondrias de hígado se utilizó un protocolo modificado del método desarrollado por Rickwood y cols. (1987). El protocolo utilizado fue el siguiente:

Los animales fueron sacrificados, e inmediatamente se extrajo el hígado. Éste se lavó, hasta eliminar toda la sangre, pasándolo por sucesivas placas Petri, colocadas en hielo, que contenían NaCl 0.9%. Para facilitar el lavado de los tejidos, estos fueron troceados con tijeras.

Se colocaron los órganos sobre papel secante para eliminar el exceso de NaCl. Se pesaron y se añadieron 2 mL de tampón de mitocondrias /g de hígado. La composición del tampón de mitocondrias es la siguiente: sacarosa 0.25M, tris 10 mM pH 7.6 (el tampón de mitocondrias debe encontrarse siempre a 4°C). Se homogeneizaron los tejidos en un homogenizador a 980 r.p.m. El homogenado obtenido se transfirió a tubos de centrifuga. Se centrifugó a 600 g durante 5 minutos, a 4°C. El sobrenadante obtenido se guardó en hielo. El precipitado se resuspendió en 3 mL de tampón de mitocondrias y se centrifugó a 600 g, durante 5 minutos, a 4°C. Se recogió el sobrenadante obtenido y se unió al obtenido en la centrifugación anterior. El sedimento con restos celulares se desechó. Se centrifugaron los sobrenadantes a 15000 g, 10 minutos, a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 3 mL de tampón de mitocondrias y se centrifugó nuevamente a 15000 g, durante 10 minutos a 4°C, para el lavado de mitocondrias. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se volvió a resuspender en 3 mL de tampón de mitocondrias, si sólo había un tubo por muestra, y se pasó a un tubo de centrifuga previamente pesado, en el caso de varios tubos de muestra, se resuspenden los precipitados correspondientes en un volumen total de 3-6 mL y se reúnen en un mismo tubo de centrifuga previamente pesado. Se repitió el lavado con centrifugación a 15000 g, durante 10 minutos, a 4°C. Se desechó el sobrenadante, de modo que el precipitado quedase lo más limpio posible, y esto constituye las mitocondrias aisladas. Se pesaron los tubos con el precipitado, y por diferencia, se calculó el peso del precipitado. Se añadieron 2 μ L de tampón de mitocondrias/ mg de precipitado y se resuspendió. Posteriormente, se alicuotaron las muestras para las distintas determinaciones analíticas.

5. DETERMINACIÓN DE MACROMOLÉCULAS Y METABOLITOS.

5.1. Cuantificación de α -tocoferol en plasma e hígado.

Fundamento:

Para la extracción del α -tocoferol y otras vitaminas liposolubles presentes en el plasma, hemos seguido el protocolo establecido por Arnaud y cols. (1991) basado en una extracción en fase hexánica, mientras que para su extracción procedente del hígado nos hemos centrado en el método –también basado en extracción en fase hexánica– establecido por Podda y cols. (1999).

En ambos casos (plasma e hígado) la determinación de la cantidad de α -tocoferol presente fue llevada a cabo siguiendo las condiciones cromatográficas indicadas en el método de Arnaud y cols. (1991).

Preparación de las muestras:

Sangre:

Con una jeringuilla heparinizada se recogió la sangre de la arteria aorta abdominal de la rata anestesiada (ver apartado 2 de Métodos. Obtención y manipulación de muestras biológicas). Se centrifugó a 700g durante 5 minutos. Se recogió el plasma sobrenadante y se guardó a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Hígado:

Se extrajo el hígado de la rata anestesiada y se procedió a la técnica de "freeze-clamping", en nitrógeno líquido (Wollemberger y cols., 1960). Los tejidos se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Análisis:

Plasma:

A 100 μ L de suero se le añadieron 100 μ L de etanol. Se agitó la mezcla. Las vitaminas liposolubles fueron extraídas con 250 μ L de hexano, por agitación intensa durante 2 minutos. Los tubos se centrifugaron a 700 g durante 5 minutos. 125 μ L de la fase hexánica fueron transferidos a un nuevo tubo y evaporados hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno. El residuo se disolvió en 100 μ L de fase móvil, mediante agitación durante 2 minutos. Se inyectaron en el cromatógrafo 20 μ L de muestra.

Hígado:

En un tubo Potter-Elvehjem con 2 mL de PBS 10mM (frío y sometido a atmósfera inerte de nitrógeno) y 50 μ L de butilhidroxitolueno (BHT) (1mg/mL) se añadieron 50 -100 mg de tejido. Se homogeneizó durante 1 minuto usando un pistilo de teflón. El homogenado se transfirió a un tubo protegido de la luz. Se añadió 1 mL de SDS 0.1mM y se agitó la mezcla durante 30 segundos. Tras sonicar 15 segundos, se pusieron las muestras en hielo y se volvieron a agitar durante 15 segundos. Se añadieron 2 mL de etanol (frío y sometido a atmósfera inerte de nitrógeno) y se repitieron las operaciones de agitación y sonicación. Se añadieron 2 mL de hexano (frío). Se mezcló por agitación durante 90 segundos. A continuación se centrifugó a 1000 g durante 3 minutos. Se transfirieron 1.75 mL de la fase hexánica a un nuevo tubo. Se colocó el tubo en un baño a 30 °C, y se evaporó el solvente bajo atmósfera de nitrógeno. El residuo se disolvió en 150 μ L de metanol:etanol (1:1). Se agitó durante 10 segundos, se sonicó 5 segundos y se puso la muestra en hielo. Finalmente, tras agitación durante 20 segundos más, la muestra se introdujo en el cromatógrafo. Se inyectaron 20 μ L.

Condiciones del método de HPLC:

Teniendo una visión de la absorbancia a tiempo real en un rango de 200-400 nm, se marcó en el PhotoDiode Array (PDA) una λ de 292nm, para la determinación del α -tocoferol. Se utilizó una columna Nova Pack C-18 de fase reversa. La fase móvil utilizada consiste en acetonitrilo:diclorometano:metanol, en proporción 70:20:10. El flujo establecido es de 1mL/minuto. En estas condiciones el α -tocoferol sale a un tiempo de retención de 3 minutos.

5.2. Cuantificación de α -tocoferol y retinol en plasma.

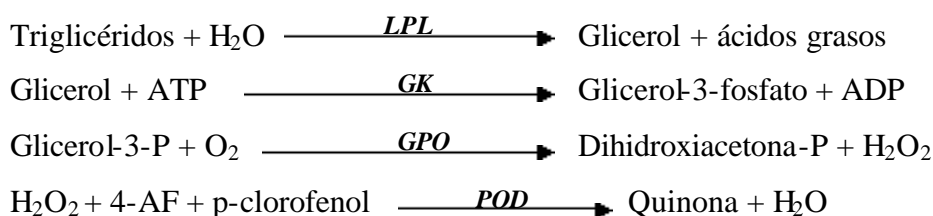
El fundamento de esta determinación, así como la preparación de la muestra y el análisis correspondiente de la misma, es el mismo que el llevado a cabo para la cuantificación del α -tocoferol en plasma (ver apartado 5.1 Cuantificación de α -tocoferol en plasma e hígado). Las condiciones cromatográficas son, de igual modo, las mismas que se establecieron para el α -tocoferol, con una única variación respecto al método descrito anteriormente: se seleccionó como longitud de onda predeterminada un valor de 298 nm en el caso del γ -tocoferol y de 325nm para el retinol, valores que

corresponden, respectivamente, con los máximos de absorbancia de estos vitámeros. En las condiciones establecidas, el tiempo de retención del retinol es de 1.7 minutos y el del γ -tocoferol de 3.5 minutos.

5.3. Determinación de triacilgliceroles en plasma.

Fundamento:

La determinación de los triacilgliceroles se basa en un test enzimático-colorimétrico (Young y cols., 1975). Los triacilgliceroles son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual, mediante la glicerol quinasa (GK) y la glicerol-P-oxidasa (GPO), libera el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder, de acuerdo a las siguientes reacciones:



La cantidad de esta quinona formada es proporcional a la concentración de triacilgliceroles.

Preparación de la muestra:

Con una jeringuilla heparinizada se recogió la sangre de la arteria aorta abdominal de la rata anestesiada (Ver apartado 2 de Métodos. Obtención y manipulación de muestras biológicas). Se centrifugó la sangre a baja velocidad durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido es el plasma donde realizamos la determinación.

Procedimiento:

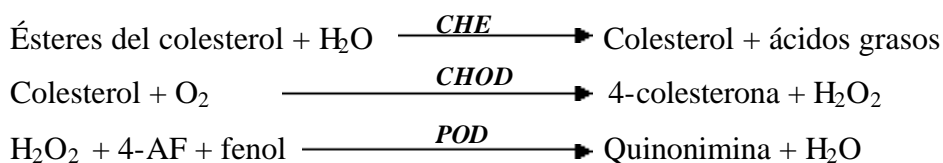
Se utilizó un kit comercial (Spinreact®). El reactivo de trabajo utilizado está compuesto por: tampón pH 7.5; p-clorofenol 2mM; lipoproteínlipasa 150 000 U/L; glicerol quinasa 500 U/L; glicerol-P-oxidasa 3500 U/L; peroxidasa 1000 U/L; 4-aminofenazona 0.1mM; ATP 0.1mM.

Se incubó 1mL de esta solución reactiva con 10 μ L de plasma, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se midió la D.O a 505nm, frente al blanco de reactivos (el reactivo de trabajo sin el plasma).

5.4. Determinación de colesterol en plasma.

Fundamento:

La determinación del colesterol presente en plasma se lleva a cabo mediante un test enzimático-colorimétrico (Fasce y Vanderlinde, 1972). La colesterol esterasa (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos; una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa (CHOD) da lugar a H_2O_2 y colesterona. El H_2O_2 se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina, en presencia de peroxidasa (POD), formando una quinonimina cuya coloración, encarnada, es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.



Preparación de la muestra:

Es el mismo procedimiento que el llevado a cabo para la determinación de triacilglicerolos (Ver apartado anterior).

Procedimiento:

Se utilizó un kit comercial (Spinreact®). El reactivo de trabajo utilizado está compuesto por: tampón Pipes 90mM pH 6.9; fenol 26mM; peroxidasa 1250 U/L; colesterol esterasa 300 U/L; colesterol oxidasa 300 U/L; 4-aminoantipirina 0.4mM. El procedimiento es el mismo que se estableció para la determinación de los triacilglicerolos.

6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

6.1. Determinación de aminotransferasas en plasma.

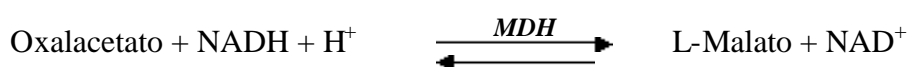
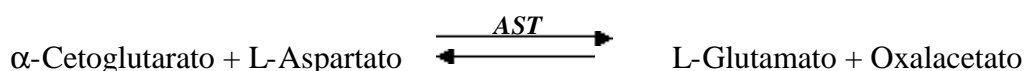
Las aminotransferasas son enzimas que catalizan el transporte de un grupo α -amino desde un aminoácido hasta un grupo cetónico de un α -cetoácido. Desempeñan un papel importante en el metabolismo intermediario de síntesis y degradación de aminoácidos. Aunque se han detectado numerosas aminotransferasas con especificidad de sustrato en diversos tejidos, sólo han sido descritas en suero la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT). Ambas se encuentran elevadas en los pacientes con enfermedades hepáticas y cardiovasculares.

Determinación de aspartato amino-transferasa.

La aspartato aminotransferasa (AST) (EC 2.6.1.1) cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L-glutámico o L-aspartico) a cetoácidos específicos (α -cetoglutarico u oxalacético). Se encuentra elevada en pacientes que sufren infarto de miocardio y hepatitis.

Fundamento:

El método de determinación que hemos utilizado fue descrito por Bergmeyer y cols. (1986a) y se basa en las siguientes reacciones acopladas:



La desaparición del NADH es proporcional a la cantidad de enzima.

Preparación de la muestra:

Se recogieron muestras de sangre arterial con una jeringa heparinizada en un tubo seco. Se centrifugaron a baja velocidad, durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido es el plasma donde realizamos la determinación.

Procedimiento:

Se utilizó un kit comercial (Spinreact®). El reactivo de trabajo utilizado está compuesto por: tampón tris 80mM, pH 7.8; L-aspartato 200 mmol/l; NADH 0.180 mmol/L; α -cetoglutarato 12 mmol/L; MDH 600 U/L; LDH 800 U/L.

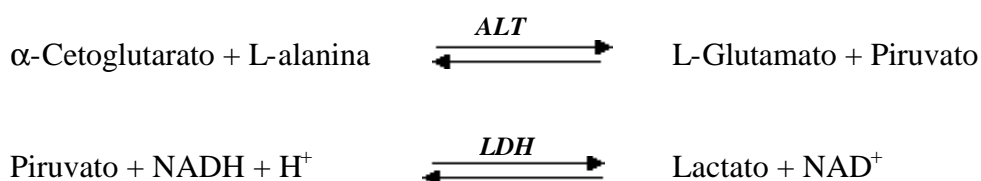
Se incubaron 750 μ L de esta solución reactiva durante 23 minutos a una temperatura establecida y controlada (25° C, en nuestro caso). A continuación se inició la reacción añadiendo 75 μ L de la muestra; transcurrido un minuto se leyó la absorbancia a 340 nm. Se realizaron nuevas lecturas a los 2, 3 y 4 minutos. Se calculó la variación de absorbancia por minuto en cada lectura y se halla el valor medio. A partir de este dato, se calcularon las UI/L.

Determinación de la alanina-aminotransferasa.

La alanina aminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2) cataliza la transferencia de un grupo amino entre la L-alanina y el L-glutamato. Los cetoácidos correspondientes de este proceso son el α -cetoglutarato y el piruvato. Esta enzima se encuentra elevada en pacientes con infarto de miocardio, hepatitis agudas (mayor aumento que la AST) y cirrosis hepáticas, entre otros.

Fundamento:

El método de determinación utilizado se basa en el descrito por Bergmeyer y cols. (1986b). Se lleva a cabo mediante las siguientes reacciones acopladas:



La cantidad de ALT en la muestra se determina por la disminución de la absorbancia a 340 nm, debida al consumo de NADH.

Preparación de la muestra:

La muestra se prepara de manera idéntica a la explicada para la determinación de la AST (ver apartado anterior).

Procedimiento:

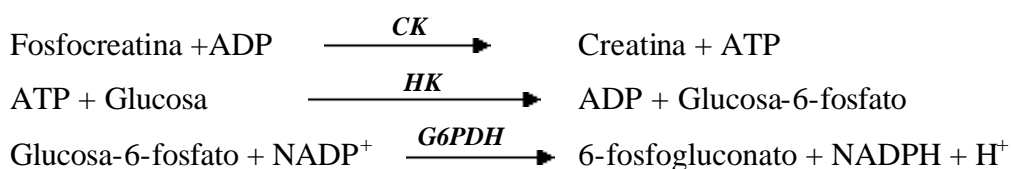
Se utilizó un kit comercial (Spinreact®). El reactivo de trabajo utilizado está compuesto por: tampón tris 100 mM, pH 7.8; L-alanina 500mmol/L; NADH 0.180 mmol/L; α -cetoglutarato 16.5 mmol/L; LDH 1200 U/L. El procedimiento es el mismo que se llevó a cabo para la determinación de la AST (Ver apartado anterior).

6.2. Determinación de (fosfo)creatín-quinasa en plasma.

La creatín-quinasa (CK) (E.C 2.7.3.2) es una enzima intracelular, ampliamente distribuida en los tejidos del organismo. Su función fisiológica está asociada con la generación de ATP para sistemas contráctiles o de transporte. Los niveles elevados de esta enzima se asocian con infarto de miocardio. También se asocian valores por encima de los normales en todos los casos de distrofia muscular, hipotiroidismo, infarto pulmonar y enfermedad cerebrovascular aguda.

Fundamento:

El método de determinación utilizado (Szasz y cols., 1976) se lleva a cabo, previa activación de la enzima mediante N-acetilcisteína, de acuerdo con las siguientes reacciones acopladas:



La formación de NADPH es proporcional a la cantidad de enzima presente en el medio.

Preparación de la muestra:

La muestra se prepara de la misma manera que para la determinación de la AST (ver apartado anterior).

Procedimiento:

Se utilizó un kit comercial (Spinreact®). El reactivo de trabajo utilizado está compuesto por un tampón imidazol 100mM pH 6.7; glucosa 20mM; acetato de

magnesio 10mM; EDTA 2mM A esta mezcla se le añade de forma extemporánea: ADP 2mM; AMP 5mM; diadenosín-5-fosfato 10mM; NADP⁺ 2mM; hexoquinasa 2500 UI/L; G-6-PDH 1500UI/L; N-acetilcisteína 20mM.

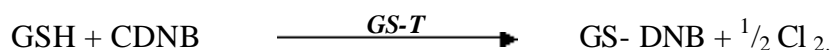
Se incubaron 750 µL de esta solución reactiva junto con 75µL de plasma durante 2-3 minutos. La reacción se inicia por adición de 75 µL del sustrato, el creatín-fosfato (30mM, en tampón imidazol 100mM pH 6.7). Mezclamos, esperamos 2 minutos y leemos la absorbancia a 340 nm. Mantenemos el registro del cambio de absorbancia durante 3 minutos más. Se calcula el cambio de absorbancia media por minuto.

7. VALORACIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO.

7.1. Valoración de GSH.

Fundamento:

Para la determinación de GSH se siguió el método descrito por Brigelius y cols. (1983). Este método se basa en la conjugación del GSH de la muestra con el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), catalizada por la glutation-S-transferasa (GS-T).



El GS-DNB formado absorbe luz a 340 nm de longitud de onda, siendo proporcional el cambio de extinción medido espectrofotométricamente a la cantidad de GSH presente en la muestra.

Preparación de la muestra:

Hígado:

Se determinó GSH en hígado de rata. Por cada 0.25g de tejido se añadió 1mL de ácido perclórico (PCA) al 6% y EDTA 1mM. Se disgregó la muestra en un homogeneizador a 980 r.p.m. Durante el proceso el vaso de homogeneización se mantuvo en hielo. Las muestras se centrifugaron a 15000 g, durante 15 minutos, a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se mantuvieron en hielo hasta el momento de su análisis.

Mitocondrias:

Una vez aisladas las mitocondrias se resuspendieron en tampón de mitocondrias (sacarosa 0.25 M; tris 10 mM, pH 7.6) (2µL/mg mitocondrias). A continuación se añadió un volumen 10 veces menor que el de las mitocondrias de PCA al 60% y EDTA 10mM, obteniendo así una concentración final de PCA al 6%. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g, durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante en un tubo eppendorf, y se guardaron las muestras a -20 °C hasta su análisis. Los sobrenadantes ácidos no deben neutralizarse hasta momentos antes de la determinación, ya que el GSH se oxida rápidamente en soluciones neutras o alcalinas. La muestra se neutralizó con carbonato potásico(K₂ CO₃ 5%) en el momento de su análisis, sólo en aquellos casos en que fué necesario (muestras muy diluidas en las que se usaba un volumen mayor de 100µL).

Procedimiento:

En una microcubeta se colocó la siguiente mezcla reactiva: 750 µL de tampón fosfato potásico 0.1M, EDTA 1mM; 10 µL de CDNB 10 mM disuelto en etanol y 10-100 µL de muestra ácida.

La absorbancia se leyó a 340 nm, realizando una línea base el registrador del espectrofotómetro (E₁). Se añadieron 5 µL de glutatión transferasa (GS-T)(12 UI/mL) y se leyó la absorbancia hasta que hubo finalizado la reacción (E₂). La diferencia (E₂ -E₁) es proporcional a la cantidad de GSH existente en las muestras.

La GS-T debe ser dializada previamente. Para ello, se utilizó un saco de membrana de diálisis (Sigma[®], de 16mm de diámetro x 30cm de longitud) en cuyo interior se introdujeron 5 mg de enzima por 0.8 mL de tampón fosfato potásico 0.1M, EDTA 1mM, pH 7. La membrana y su contenido se colocan en un vaso de precipitados con el mismo tampón, en frío y con un agitador magnético. Tras cambiar el tampón tres veces, cada 2 horas, se obtuvo la enzima dializada. La enzima debe conservarse a -20°C. La actividad de la misma se comprobó con un análisis patrón.

7.2. Valoración de GSSG.

Fundamento:

Para la determinación del glutatión oxidado se utilizó el método de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), descrito por Asensi y cols. (1994a, 1994b).

El método inicialmente descrito por Reed y cols. (1980), y posteriormente modificado por Farris y Reed (1987) se basa en la protección de los tioles libres mediante la formación de S-carboximetil derivados, para en una segunda fase formar los 2,4-dinitrofenil derivados. Posteriormente éstos son separados mediante HPLC en fase reversa e intercambio iónico. Este también es el fundamento del método de Asensi y cols., pero la ventaja de éste es que utiliza N-etil-maleimida (NEM) en lugar de ácido yodoacético, ya que aquel reacciona con más rapidez. El NEM se une rápidamente en medio ácido al grupo tiólico del GSH para evitar la autooxidación de éste, evitando así obtener valores erróneamente elevados de GSSG debidos a la autooxidación del GSH durante la preparación de la muestra.

Preparación de la muestra:

Hígado:

Por cada 0.25g de tejido se añadió 1mL de PCA 6%, ácido batofenantrolinedisulfónico (BPDS) 1mM (como quelante metálico) y N-etil-maleimida (NEM) 20 mM. Se homogenizó la muestra en un homogenizador a 980 r.p.m. El vaso de homogenización se mantuvo en hielo durante el proceso. Las muestras se centrifugaron a 15000 g, durante 10 minutos, a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C hasta el momento de derivatización.

Mitocondrias:

Una vez aisladas las mitocondrias se resuspendió el precipitado en tampón de mitocondrias (sacarosa 0.25 M; tris 10 mM, pH 7.6) en una relación 2µL /mg precipitado. La suspensión de mitocondrias se acidificó con PCA al 30%, BPDS 5mM, NEM 100mM, añadiendo una cantidad suficiente para que la concentración final sea al 6% de PCA. Se centrifugaron las muestras a 15000 g, durante 10 minutos a 4°C. Se

recogió el sobrenadante en un tubo eppendorf, y se guardaron las muestras a -20°C hasta su correspondiente derivatización.

Derivatización:

Hígado:

Una vez centrifugada la muestra, se recogieron 300 μL de sobrenadante y se añadieron 30 μL de púrpura de meta-cresol 0.2 mM. Posteriormente las muestras se neutralizaron con una disolución de KOH 3M y ácido 2-N-ciclohexilamino etanosulfónico (CHES) 0.3M. Para prevenir la alcalinización excesiva se volvieron a centrifugar las muestras a 15000 g, a 4°C , durante 15 minutos. Se tomaron 50 μL de sobrenadante y se le añadieron 100 μL de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) al 1% disuelto en etanol. Se incubaron las muestras durante 45 minutos en oscuridad, pasado ese tiempo se desecaron en una bomba de vacío a 70 mtorr. Una vez desecadas, se guardaron a -20°C hasta el momento del análisis cromatográfico. Llegado el momento, se disolvió el liofilizado en 160 μL de fase móvil A [metanol:agua (80:20)]. Se centrifugó la muestra 5 minutos a 1000g. Se inyectaron 45 μL del sobrenadante en el HPLC.

Mitocondrias:

En el proceso de derivatización de mitocondrias existen pequeñas modificaciones respecto al del hígado, debido a la menor concentración de GSSG existente. El proceso inicialmente es igual que el descrito para el hígado pero, en este caso, después de la primera centrifugación tras añadir el KOH-CHES, se tomaron 100 μL de sobrenadante y se añadieron 100 μL de FDNB 1% disuelto en etanol. Al igual que antes, se incubaron las muestras durante 45 minutos en oscuridad; posteriormente, se desecaron en una bomba de vacío a 70 Torr, y se almacenaron a -20°C hasta el momento de ser inyectadas. En este caso, para la inyección en el cromatógrafo se disolvió el liofilizado en 120 μL de fase móvil A.

Análisis:

Fase móvil. La fase móvil es en gradiente, mediante el uso de 2 bombas y dos eluyentes distintos. Fase A: Solución de metanol al 80%. Fase B: Solución de acetato

sódico 0.5M en metanol al 64%. La preparación de la solución de acetato sódico se realizó tal como describen Farris y Reed (1987)

Fase estacionaria. Se utilizó una columna Spherisorb aminada. Las dimensiones de la columna son de 20 x 0.46 cm. El tamaño de partícula de relleno es de 5µm de diámetro.

Gradiente. La composición inicial de la fase móvil es 80% fase A: 20% fase B. Esta proporción es mantenida durante 5 minutos. Posteriormente se llevó linealmente a 1% fase A: 99% fase B durante 10 minutos. Estas condiciones, que son en las que el GSSG eluye, se mantuvieron durante 35 minutos. Luego se recuperó la columna a las condiciones establecidas inicialmente durante unos 10 minutos.

El volumen de muestra que se inyecta en el cromatógrafo es de 45 µL. Todo el análisis se realizó a un flujo constante de 1mL/minuto. La elución de los distintos compuestos se detectó a una longitud de onda de 365nm.

Usando este método el cromatograma obtenido es el siguiente: el aducto GSH-NEM se descompone en 3 picos que eluyen a los minutos 12, 15 y 16. Al minuto 19 aparece un pico de menor tamaño, correspondiente al GSSG .

Nota: Este método no es adecuado para la medida del GSH, a pesar de la aparición de éstos picos correspondientes a este compuesto. La medida del GSH debe ser determinada mediante un método enzimático -glioxilasa o como en nuestro caso, el de la glutatión peroxidasa-.

7.3. Valoración de los niveles de malondialdehído.

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, provocando su peroxidación y produciéndose pérdida de la flexibilidad de la membrana y de las funciones secretoras, así como ruptura de los gradientes iónicos transmembrana. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo el mayoritario de ellos el malondialdehído.

Fundamento:

Para la determinación de la concentración de malondialdehído (MDA) utilizamos un método de HPLC, descrito por Wong y cols. (1987). Este método se basa en la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos presentes en el plasma o mitocondrias, con

ácido ortofosfórico diluido, a una temperatura de 100 °C. La reacción del MDA, producto mayoritario de la hidrólisis ácida de los lipoperóxidos, con el ácido tiobarbitúrico (TBA) nos permitió cuantificar los aductos [MDA-TBA₂], a 532 nm .

Preparación de las muestras:

Hígado:

Se homogeneizó el hígado con tampón fosfato 0.1M y EDTA 1mM, pH 7, siguiendo la proporción de 0.1g de tejido/ 1mL de tampón fosfato, en un homogeneizador a 980 rpm. Durante el proceso el vaso de homogeneización se mantuvo siempre en hielo. Las muestras se almacenaron a -20° C hasta el momento de su análisis.

Mitocondrias:

Una vez aisladas las mitocondrias de hígado se resuspendieron en tampón de mitocondrias (sacarosa 0.25M; tris 10mM, pH 7.6). Se alicuotó una cantidad suficiente para la determinación de MDA. Esta muestra se mantuvo a -20 °C hasta el momento de análisis.

Análisis

Preparamos la mezcla de reacción con: 75µL de ácido ortofosfórico 0.44M + 25µL de TBA + 50 µL de suspensión mitocondrial u homogenado de hígado, según el caso. Posteriormente la mezcla de reacción se calentó a 100°C durante 1 hora, y se dejó enfriar en hielo. A continuación neutralizamos los 150 µL de la mezcla de reacción con 150 µL de una solución compuesta por 4.5mL de acetonitrilo + 0.5 mL de NaOH 1M, se agito y se centrifugó a 15000 g a 4 °C, durante 5 minutos, precipitando así las proteínas. Se recogió el sobrenadante y se inyectaron en el cromatógrafo 25 µL antes de que transcurrieron 10 minutos desde la neutralización de la muestra, porque a pH neutro el aducto [MDA-TBA₂] es inestable.

Condiciones del método de HPLC:

Se estableció el PDA a una longitud de onda de 532 nm. Se utilizó una columna Nova-Pack C-18. La fase móvil estaba compuesta por una mezcla KH₂PO₄ /K₂ HPO₄ 50

mM pH 6.8 y acetonitrilo en proporción 85:15. El flujo establecido es de 1 mL/ minuto. En estas condiciones el tiempo de retención del MDA es de 5 minutos.

8. ANÁLISIS DE LA ULTRAESTRUCTURA HEPÁTICA POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA.

El hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E fue procesado y tratado para su estudio por microscopía electrónica tal como se describe en el protocolo establecido por Sancho-Tello y cols. (1987). El protocolo se desarrolló tal como se describe a continuación:

Fijación y tinción. Pequeños fragmentos de hígado se pusieron en contacto con una solución de 1% de paraformaldehído y 1.5% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0.1M, pH 7.4, durante 60 minutos a 4 °C. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos en tampón cacodilato, a 4°C. Tras los lavados las muestras se pusieron en contacto con una solución de tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro potásico al 1%, durante 60 minutos a 4°C, en oscuridad. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada a 4°C. A continuación, las muestras se fijaron en ácido tánico 0.15%, en tampón cacodilato, 1 minuto, a temperatura ambiente. Tras ser lavadas a temperatura ambiente con tampón cacodilato, y posteriormente con agua destilada (2 lavados de 5 minutos), las muestras se pusieron en contacto con una solución de acetato de uranilo al 2% en agua bidestilada, 120 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, tras lo cual, se realizaron 3 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente

Deshidratación. Las muestras fueron deshidratadas mediante el tratamiento con etanol, en un gradiente creciente de concentración.

Infiltración. Las muestras deshidratadas se infiltraron en Epon 812, resina epoxi alifática de naturaleza hidrofóbica, muy útil para estudios ultraestructurales. Todos los recipientes utilizados para su preparación deben estar bien secos, ya que la humedad dificulta la polimerización. Una vez finalizado este proceso, las muestras deben quedar completamente sumergidas en resina.

Encapsulado y polimerización. Las muestras fueron depositadas en el fondo de cápsulas de gelatina, que se rellenaron con Epon completo recién preparado, y se

colocaron en estufa a 60 °C durante 48 horas. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Finalmente, en el momento del análisis se cortaron las muestras con un ultramicrotomo y se examinaron por microscopía electrónica.

9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR.

9.1. Aislamiento de RNA total.

Fundamento:

Para aislar RNA total a partir de tejido de rata se utilizó el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987), en el que un homogenado de tiocianato de guanidina se extrae con fenol:cloroformo a pH reducido. El tiocianato de guanidina es un agente caotrópico que rompe las células, solubiliza sus componentes y desnaturaliza las RNAsas endógenas simultáneamente.

Procedimiento:

Se extrajo el hígado de la rata sacrificada y se procedió a la técnica de "freeze-clamping" en nitrógeno líquido (Wollemberger, 1960). El tejido se mantuvo a -80 °C hasta el momento de su análisis.

En el momento del análisis se tomó un trozo de tejido congelado (0.1 - 0.5 g) en 2 mL de solución desnaturalizante (solución D), y homogeneizamos en un Ultraturax. La solución D está formada por: tiocianato de guanidina 4M; citrato sódico pH 7, 25mM; lauril sarcosinato sódico (sarcosyl) 0.5% (p/V); β - mercaptoetanol 0.1M. Se puede preparar una solución stock, estable durante meses, con todos los componentes a excepción del β - mercaptoetanol, que debe ser añadido de forma extemporánea.

Se colocaron en eppendorf de 2 mL, 500 μ L del homogenado por tubo. Se mezclaron los homogenados con una jeringuilla de insulina para disgregar el DNA. Se añadió a cada tubo 50 μ L de acetato sódico 2 M pH 4 + 500 μ L de fenol/agua + 100 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Entre un reactivo y otro se agitó la mezcla. Tras incubar 15 minutos en hielo, se centrifugaron las muestras a 15000 g, durante 20 minutos en frío (0-4°C). A continuación, se traspasó la fase acuosa que contiene el RNA a un nuevo tubo de 2 mL (en este paso se procuró no arrastrar material de la interfase,

ya que aquí se encuentra el DNA). Se añadió 1 volumen de isopropanol, y se mezcló por inversión. Se dejó precipitar la muestra 1 hora a - 20 °C. A continuación se centrifugó a 15000 g durante 20 minutos en frío (0-4 °C). Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500µL Cl Li 4M, mediante agitación. Tras esto, se dejó la muestra en hielo durante 4 minutos, y posteriormente se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. Se resuspendió el sedimento en 300 µL de solución D, y se añadió un volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se dejó precipitar la muestra 1 hora a -20 °C (en este caso se puede dejar toda la noche). Tras la precipitación, se centrifugó a 15000 g, durante 15 minutos en frío (0-4 °C). Se lavó el sedimento con 0.5 mL de etanol 70 % frío (-20°C), y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos en frío (0-4°C). Se repitieron los lavados con etanol 1 ó 2 veces. Se puso el sedimento a secar, y posteriormente se resuspendió con 20-50 µL de agua tratada con dietil-piropiridato (DEPC), según el tamaño del sedimento.

Cuantificación del RNA total aislado.

Para saber la concentración a la que se encuentra el RNA aislado, recurrimos a un método espectrofotométrico, basado en la absorbancia que poseen los ácidos nucleicos a 260 nm. Se midió la absorbancia a 260nm -que nos proporciona la concentración- y a 280 nm, pues el cociente de estas 2 absorbancias nos da información de la bondad de la extracción. El cociente debe estar lo más próximo a un valor de 2.

La medida espectrofotométrica se realizó tomando el agua como blanco y usando una dilución 2:1000 en agua, del RNA original.

9.2. Cuantificación de los niveles de mRNA por RT-PCR.

Fundamento:

Para la cuantificación de los niveles de expresión de los genes que son objeto de nuestro estudio, utilizamos el análisis cuantitativo de RNA por PCR. La técnica conlleva la creación de un conjunto de cDNAs usando RNA total y transcripción inversa y posterior amplificación de un fragmento de DNA predeterminado usando oligonucleótidos específicos y un termociclador. La cantidad de transcrito específico presente se cuantifica midiendo la intensidad de la banda amplificada en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Por comparación a un mRNA estándar

coamplificado en las mismas condiciones se puede conocer la cantidad de mRNA específico presente en la muestra y por lo tanto el nivel de expresión de ese gen. En nuestro caso, tomamos como control interno el mRNA de la proteína ribosomal 26S, dado que este RNA se expresa a un nivel constante en muchos tejidos y líneas celulares cultivadas en diferentes condiciones fisiológicas (Vincent y cols., 1993).

Procedimiento:

RT:

Se colocó en cada tubo el volumen de RNA equivalente a 2 μ g y se añadió agua DEPC hasta un volumen de 11 μ L. Se añadió a cada tubo 1 μ L de oligo dT 100 μ M. Se preincubaron las muestras en el termociclador 70°C durante 10 minutos. Tras esto, se añadieron a cada tubo 8 μ L de una mezcla formada por: 4 μ L de tampón 5X (Gibco®); 2 μ L de ditioneitol (DTT) 0.1 M; 1 μ L de dNTPs 10 mM; 1 μ L de la enzima RT (Gibco®). La mezcla de reacción se introdujo en el termociclador y se llevó a cabo la RT : 50 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C. Tras este proceso obtuvimos el cDNA total.

PCR:

Para llevar a cabo la PCR se tomó una alícuota del cDNA obtenido. Las cantidades se ajustaron para mantener la linealidad de la PCR. Se añadió a cada tubo una mezcla formada por: 5 μ L de tampón de PCR 10X; 5 μ L de dNTPs 2.5 mM; 2 μ L de MgCl₂; 0.5 μ L del oligo dirección 5'-3' 100 μ M; 0.5 μ L del mismo oligo dirección 3'-5' 100 μ M; 0.5 μ L de la enzima polimerasa, y agua DEPC (hasta un volumen final de 50 μ L). Se introdujeron los tubos en el termociclador y se estableció el siguiente programa: 5 minutos a 95°C (desnaturalización); n ciclos [cada ciclo consta de: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a temperatura "t" (temperatura de *annealing*), 30 segundos a 68°C (elongación)]; 10 minutos a 72°C; y conservación a 4°C, hasta el momento de su análisis. Si éste no se llevó a cabo en el mismo día, las muestras se mantuvieron a -20°C. Tras este proceso obtenemos cDNA amplificado en la zona de interés.

Para los distintos genes estudiados (ver tabla III. 2) el programa es el mismo, pero según el oligonucleótido que hayamos usado determinaremos una temperatura de *annealing* u otra, y mayor o menor número de ciclos. En el caso del control interno, la

proteína ribosomal 26S se amplifica en un rango bastante amplio de temperatura, lo que permite co-amplificarlo en las mismas condiciones que las del gen de interés.

Tabla III. 2. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA EL ANÁLISIS POR PCR.

Oligo	Secuencia	Tamaño
<i>c-jun</i>	5' – TGAGTGCAAGCGGTGTCTTA – 3' 5' – TAGTGGTGATGTGCCCATG – 3'	471 pb
<i>Ciclina D1</i>	5' – TGTTTCGTGGCCTCTAAGATGA – 3' 5' – GCTTGACTCCAGAAGGGCTT – 3'	454 pb
<i>Ciclina E</i>	5' – CCTCCAAAGTTGCACCAGTTT – 3' 5' – TTGCTTGGGCTTTGTCCA – 3'	507 pb
<i>γ-GCS catalítica</i>	5' – TGGATTACACTGCCAGAGC – 3' 5' – CACCTGAAGACAGCAGTTGC – 3'	298 pb
<i>γ-GCS reguladora</i>	5' – ATG CCA TGG GAT TTG GGA – 3' 5' – CATTGTCTGCCAGTTTGTGGA – 3'	511 pb
<i>p21</i>	5' – ACAGCGATATCGAGACACTCA – 3' 5' – GTGAGACACCAGAGTGCAAGA – 3'	400 pb
<i>UCP2</i>	5' – TCTAGACACGGCCAAAGT – 3' 5' – GTCATGAGGTTGGCTTTC – 3'	533 pb
<i>UCP3</i>	5' – CAACATCACAAGAAACGCCA – 3' 5' – CCCATCTGGTCAGTGCAAA – 3'	599 pb
<i>26S</i>	5' – CAGCAGGTCTGAATCGTGGT – 3' 5' – AATTCGCTGCACGAACTGCG – 3'	250 pb

Electroforesis de cDNA amplificado en gel de agarosa.

La preparación del gel consiste en calentar 1.5 g de agarosa en 100 mL de tampón tris-ácido acético- EDTA (TAE), a 60 °C, hasta la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se dejó enfriar y se añadieron 5 µL de bromuro de etidio al 1%. Se vertió la agarosa una cubeta horizontal y se dejó polimerizar. Las muestras de cDNA fueron mezcladas con tampón de carga en proporción 1:1. Posteriormente se centrifugaron las muestras y se cargaron 25µL de muestra en cada pocillo. Paralelamente se cargó en uno de los pocillos un marcador de pares de bases (de fragmentos de 100pb).

Para llevar a cabo la electroforesis se cubrió todo el gel con tampón de electroforesis (TAE 1X) y se puso en marcha a voltaje constante de 100 V, durante una

hora. Las bandas fueron observadas bajo radiación UV de una cámara asociada a un ordenador, mediante el programa informático “*Gene Snap*” y densitometradas mediante el programa “*Gene Tools*” del sistema de documentación de geles Syngene®.

10. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES Y ENSAYO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA).

10.1. Obtención de extractos nucleares de hígado.

Fundamento:

Se llevó a cabo el protocolo descrito por Digman y cols. (1983) con modificaciones (Deryckere y Gannon, 1994). Este método requiere la rotura de las células /tejido con la consecuente separación de los núcleos respecto de la fracción citoplasmática. Una vez aislada la fracción nuclear, los núcleos se exponen a un tampón de elevada fuerza salina, que libera las proteínas localizadas en el núcleo. Esta suspensión, tras un pulso de centrifuga, nos proporciona un sobrenadante enriquecido en proteínas nucleares.

Procedimiento:

Se tomaron 50-100 mg de hígado congelado, se colocaron en una placa *Petri*, con una pequeña cantidad de tampón 1 [10mM HEPES; 10 mM $MgCl_2$; 5mM KCl; 0.1mM EDTA; 0.1% Tritón X-100; 1mM DTT; 100 μ L de inhibidor de proteasas (Sigma®)], y con unas tijeras se disgregó el tejido. Se vertió el contenido de la placa a un tubo de 50 mL que contiene el resto del tampón 1(hasta 35mL). Se homogeneizó en Ultraturrax a velocidad media durante 45s. Se centrifugó a 3000 g, 7 minutos a 4°C. En este paso precipitaron los núcleos. El sedimento se resuspendió en 450 μ L de tampón 2 [20mM HEPES; 1.5mM $MgCl_2$; 500mM NaCl; 0.2mM EDTA; 25% glicerol; 0.5mM DTT; inhibidor de proteasas (Sigma®)]. Se traspasó el contenido a un eppendorf. Se incubó la mezcla 30 minutos en hielo, agitando de forma intermitente. Se centrifugó 5 minutos a 15000 g a 4°C. Se transfirieron 225 μ L del sobrenadante a un eppendorf con filtro de 30KD (Columnas Sigma®). Se añadió a cada tubo un volumen idéntico de tampón 3, *tampón de unión* [20mM HEPES; 2mM $MgCl_2$; 40mM KCl; 10% glicerol; 0.5mM DTT; inhibidor de proteasas (Sigma®)]. Se centrifugó a 15000 g a 4°C, el

tiempo suficiente para obtener un volumen adecuado (~200µL). Se añadieron nuevamente 200µL de tampón 3, y se centrifugó de nuevo a 15000 g, el tiempo necesario para obtener un volumen final de ~50µL. La muestra concentrada se alicuotó y se guardó a -80°C hasta el momento de su uso.

10.2. EMSA.

Fundamento:

El estudio de las interacciones DNA- proteína ha sido facilitado enormemente en los últimos años gracias a la técnica de retraso en gel (“*gel retardation*” o “*electrophoretic mobility shift assay*” (EMSA)). Esta técnica está basada en la separación del DNA libre de los complejos DNA – proteína, debido a diferencias en su movilidad electroforética en geles de acrilamida o agarosa en condiciones no desnaturalizantes (Kerr, 1995).

Utilizamos un kit (*DIG Gel Shift*[®], Roche) que utiliza la técnica de marcaje con digoxigenina para detectar proteínas unidas a secuencias específicas de DNA.

Procedimiento:

Marcaje de los oligonucleótidos. Se marcaron en el extremo 3' con digoxigenina-11-ddUTP los oligonucleótidos que contienen la secuencia consenso para NF-κB (5'- GTACGGAGTATCCAGCTCCGTAGCATGCAAATCCTCTGG- 3').

Formación de los complejos oligonucleotido- proteína. El fragmento de DNA marcado que contiene la secuencia de interés se incubó con un extracto celular o un extracto purificado de proteína unida al DNA. Para ello procedimos de la siguiente manera: se colocó en tubos eppendorf 6µL de una mezcla compuesta por (composición por tubo): 4 µL de *tampón de unión* 5X (HEPES 100mM, pH 7.6; EDTA 5mM; SO₄(NH₄)₂ 50mM; DTT 5mM; Tween 20, 1% (p/v); KCl 150mM) + 1µL poli [d (I-C)] (1µg /µL) + 1µL poli L-lisina. A cada tubo se añadió el volumen necesario de cada muestra para tener 40 µg de proteínas nucleares y finalmente se añadió agua hasta 12 µL de volumen final. Estas muestras se incubaron 15 minutos en hielo. Transcurrido ese tiempo se añadieron a cada tubo 2 µL del oligo marcado. En el caso de la muestra que se va a usar como control negativo, mediante inhibición por competición, se añadió oligo no marcado, en una concentración 100X de la utilizada en el caso del oligo

marcado. En estas muestras, 15 minutos después se añadieron 2 μ L del oligo marcado. Las muestras se dejaron 30 minutos en hielo (15 minutos tras la adición del oligo marcado, en el caso de la muestra de inhibición). Transcurrido el tiempo, se añadieron a cada muestra 5 μ L de tampón de carga y se procedió a cargar las muestras en el gel para ser sometidas a electroforesis.

Electroforesis. Para la electroforesis se utilizaron geles verticales de 1.5mm de espesor, de poliacrilamida no desnaturizante al 8% en tampón TBE 0.25X preparado a partir de TBE 10X (tris 890mM; ácido bórico 890mM; EDTA 20mM pH 8). Como tampón de electroforesis se utilizó también TBE 0.25X. Se cargaron las muestras y se desarrolló la electroforesis a 80V durante 1-1.30 h. Nota: previamente a la carga de las muestras se debe someter el gel a un voltaje de 80V durante 10 minutos, para eliminar los restos de acrilamida de los pocillos.

Transferencia. Después de la separación electroforética los complejos oligonucleótido-proteína son transferidos a membranas de nylon, cargadas positivamente, mediante electro-transferencia en semiseco. Las condiciones de transferencia se desarrollaron fijando el amperaje a 40 A. Una vez llevada a cabo la transferencia, se procedió a fijar los complejos oligonucleótidos-proteína a la membrana, sometiendo a ésta a un "cross-linking", con luz UV.

Detección inmunológica. Los fragmentos de DNA u oligonucleótidos marcados con digoxigenina se visualizaron mediante un enzimo- inmuno ensayo, usando anticuerpos anti-digoxigenina-AP y el sustrato quimioluminiscente CSPD. Para esto, procedimos de la siguiente manera: se lavó la membrana 3 minutos con *tampón de lavado* (ácido maleico 0.1M; NaCl, 0.15M; NaOH hasta pH 7.5). Se incubó 30 minutos en 100mL de *solución bloqueante* (kit Roche®). A continuación se incubó otros 30 minutos en 20mL de *solución de anticuerpo* (dilución 1:10 000 del anticuerpo anti-digoxigenina-AP en *solución bloqueante*). Después se realizaron 2 lavados de 15 minutos en 100mL de *tampón de lavado*. Se equilibró la membrana durante 5 minutos con 20mL del *tampón de detección* (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; NaCl 0.1M, pH 8). A continuación, se colocó la membrana en una bolsa de hibridación y se añadió 1mL de *solución de trabajo CSPD*. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos más a 37°C para mejorar la reacción quimioluminiscente.

Detección de la señal quimioluminiscente. Se expuso la membrana durante 15-25 minutos como mínimo (hasta un máximo de 48 horas) a un film de rayos X, que recoge la señal quimioluminiscente generada.

11. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE FRAGMENTOS DE CROMATINA (ChIP assay).

Fundamento:

Esta técnica permite identificar la presencia de proteínas (histonas modificadas, factores de transcripción y proteínas cromosómicas no-histonas) unidas directa o indirectamente al DNA. Es una técnica que ofrece una mejor representación fisiológica de los procesos nucleares involucrados en el procesamiento del DNA (Spencer y cols., 2003). Se basa en el entrecruzamiento con formaldehído y la inmunoprecipitación de los complejos cromatínicos resultantes. Se utiliza formaldehído para establecer enlaces covalentes entre las proteínas y las secuencias de DNA adyacentes. La cromatina entrecruzada es sonicada para conseguir los tamaños deseados (500-1000pb). Los fragmentos de DNA y los complejos de proteínas de interés unidos a éstos son inmunoprecipitados con anticuerpos frente a las proteínas presuntamente entrecruzadas. Los fragmentos de cromatina inmunoprecipitados pueden ser entonces examinados por PCR con oligonucleótidos específicos (Weinmann y Farnham, 2002; Wells y Farnham, 2002) (ver Figura III.1). De este modo, medimos la relación existente entre la unión de un factor de transcripción y la regulación específica de un gen concreto. Si se estudia además la presencia de la RNA polimerasa II en un exón se puede relacionar la unión del factor de transcripción con la transcripción del gen.

Procedimiento:

Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Borrás y cols. (2003), con modificaciones. Los animales fueron anestesiados tal y cómo se detalla en el apartado 2. de Métodos. Las muestras de tejido hepático fueron extraídas, pesadas y sumergidas en 30mL de PBS con formaldehído al 1%, durante 12 minutos, en rotación, a temperatura ambiente. El entrecruzamiento se realizó mediante enlaces carbamida el DNA con los factores nucleares, proteínas reguladoras y remodeladores de la cromatina. La reacción se detuvo por adición de glicina a una concentración final de 0.125M. Las muestras se centrifugaron a 190g, 5 minutos, se lavaron dos veces con 10mL de PBS pH

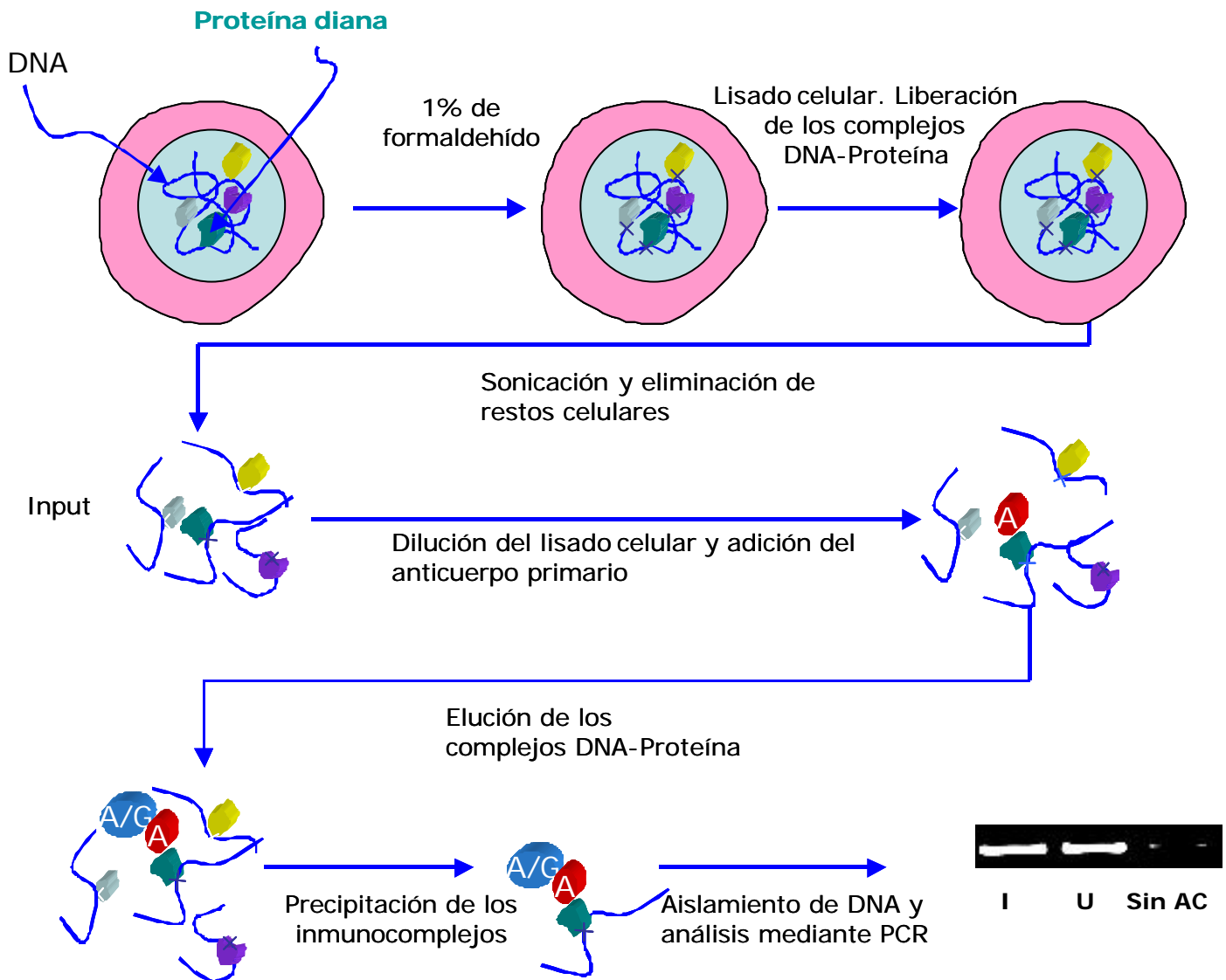
7.4 y se resuspendieron en 10mL de PBS. El tejido se disgregó en un homogeneizador y se centrifugó a 1000g durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en *tampón de lisis celular* (HEPES 5mM; KCl 85mM; NP-40 0.5%, pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, se incubaron en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 5000 g durante 5 minutos para recoger los núcleos. Los sedimentos nucleares se resuspendieron en 3mL de *tampón de lisis nuclear* (Tris-HCl 50mM; EDTA 10mM; SDS 1%, pH 8.1) y se almacenaron a -20°C en alícuotas hasta su uso.

Para obtener los fragmentos de cromatina para la inmunoprecipitación, los núcleos lisados se sometieron a sonicación. Cada muestra se sonicó 10 ciclos de 10 segundos, siendo mantenidas en hielo entre ciclos durante 1 minuto. A continuación fueron centrifugadas a 15000 g durante 10 minutos para eliminar los residuos celulares. Los sobrenadantes, conteniendo los fragmentos de cromatina solubles, se transfirieron a nuevos tubos, y se determinó su concentración de DNA. Cantidades equivalentes de muestra se diluyeron 10 veces y se prelavaron con 20 $\mu\text{L/mL}$ proteína A/G sefarosa 1:1 (v:v) [bloqueada previamente con λDNA (250 $\mu\text{g/mL}$); BSA (10 $\mu\text{g/mL}$) y tRNA (250 $\mu\text{g/mL}$)]. Las muestras se incubaron a 4°C durante 4h en una plataforma rotatoria y se centrifugaron a 12000 g durante 1 minuto para eliminar la proteína A/G Sefarosa. Las muestras se fraccionaron en alícuotas equivalentes a 50 μg de DNA.

Los complejos de inmunoprecipitación son seleccionados mediante la adición de 2 μg del anticuerpo correspondiente frente a la proteína (factor de transcripción) de interés; en nuestro caso, utilizamos anticuerpos frente a NF- κB (p65) (sc-109), c-jun (sc-1694) y RNA polimerasa II (sc-899) (todos ellos de Santa Cruz biotechnology Inc[®]), incubándose toda la noche a 4°C en un sistema rotatorio. Como control de la inmunoprecipitación se procesa una alícuota en paralelo en ausencia de anticuerpo (ver Figura III. 1).

Las muestras se incubaron con 50 μL de proteína A/G sefarosa bloqueada durante 3 horas a 4°C , bajo agitación suave. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 12000g, 1 minuto; se recogió el sedimento con los inmunocomplejos formados por fragmentos de cromatina/anticuerpo/ proteínas A/G sefarosa (en el caso del tubo que llevaba la muestra sin anticuerpo, tomamos el sobrenadante, que corresponderá al DNA total –el unido más el no unido– que denominamos “Input”.

FIGURA III.1. ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.



El precipitado de esta muestra –que corresponde a la fracción de DNA que se une inespecíficamente a la proteína A/G sefarosa, y que teóricamente, debía ser nula- se trató en paralelo con el resto de muestras, y se utiliza como control negativo, al que se denomina “Sin Anticuerpo”

A continuación las muestras se lavan 2 veces con *tampón de baja salinidad* (Tris-HCl pH 8, 50mM; NaCl 150mM; Deoxicolato sódico 0.5%; SDS 0.1%; NP-40 1%; EDTA 1mM), dos veces con *tampón de alta salinidad* (Tris-HCl pH 8, 50mM; NaCl 500mM; Deoxicolato sódico 0.5%; SDS 0.1%; NP-40 1%; EDTA 1mM), posteriormente dos veces con *tampón de LiCl* (Tris-HCl pH 8, 50mM; EDTA 1mM; LiCl 250mM; Deoxicolato sódico 0.5%; NP-40 1%) y finalmente dos veces con *tampón TE* (Tris 10mM; EDTA 0.25mM, pH 8). La fracción de cromatina inmunoseleccionada se eluyó de la proteína A/G sefarosa mediante dos extracciones consecutivas con *tampón de elución* (NaHSO₃ 100mM; SDS 1%). Los fragmentos de cromatina aislados con el anticuerpo se incuban a continuación a 65°C durante toda la noche para romper el entrecruzamiento entre los complejos proteicos y el DNA. El DNA de las fracciones (Input, Sin Anticuerpo y el Unido) se purifica con PCR purification Kit (Quiagen®).

Análisis del DNA inmunoprecipitado.

Para determinar si la fracción de cromatina inmunoprecipitada con los diferentes anticuerpos contiene los DNAs de los promotores de los genes estudiados, las muestras de DNA (Input, Unido y Sin anticuerpo) se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla III.3.A.

En el caso del análisis de la posible unión de la RNA polIII a la zona transcribible de los genes de la γ -GCS catalítica y reguladora, se utilizaron oligonucleótidos con secuencias contenidas en esta región (Tabla III.3.B).

Tabla III.3. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS PARA EL ANÁLISIS POR PCR DEL DNA INMUNOPRECIPITADO.

A	Nombre del gen	Secuencia seleccionada del promotor	Tamaño	Posición desde el inicio de la traducción
	γ -GCS catalítica	5'-TGTAAGCATGAGGCTCCCTCC- 3' 5'- TTCCTACTTGCGACCCAAGG-3'	297 pb	-181
	γ -GCS reguladora	5'- TCGACCAGTTTCAATTCTCTATCC-3' 5'- GAGTATTTGGGCTTCCTGACATT- 3'	407 pb	-244
	Ciclina D1	5'- CCCCCTCTTTCCCAGC- 3' 5'- GCTGCCTCGCGCTCTACG-3'	333 pb	-61
	α -actina	5'- AGGGACTCTAGTGCCCAACACC- 3' 5'- CCCACCTCCACCCTACCTGC - 3'	200 pb	-1168
B	Nombre del gen	Secuencia seleccionada de la zona transcribible	Tamaño	Posición desde el inicio de la traducción
	γ -GCS catalítica	5'-TGTCTCTGAGCAGCACTTGC -3' 5'-AGAACATCGCCGCCATTAG - 3'	359 pb	19150
	γ -GCS reguladora	5'-GCAGTGGGGATGAGCCTCTG- 3' 5'- TACTCCCAGGCAACCCGAGC-3'	160 pb	13845

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados presentados en las tablas se expresan como la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento \pm el error estándar de la media (SEM). El número de animales diferentes utilizado en cada observación se indica entre paréntesis.

Para el estudio estadístico de los resultados se realizó un análisis de la varianza (Ensayo F de Snedecor). La hipótesis nula fue aceptada para todos aquellos datos de los grupos en los que F no fue significativa para un valor de $P < 0.05$. Los grupos de datos en los que F fue significativa fueron analizados por el test t de varianzas comparables. El valor de la probabilidad P, de que las diferencias entre las medias de dos conjuntos de valores fuera estadísticamente significativa, se aceptó que fuese igual o inferior a 0.05; por tanto, el margen de confianza de que los dos conjuntos comparados sean diferentes, es igual o superior al 95%.

En aquellos casos en que las varianzas fueron desiguales y por tanto F no resultó significativa, los datos fueron analizados por el test de varianzas no comparables.

“Dios no juega a los dados”

Albert Einstein

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO *IN VIVO* DE DEFICIENCIA CRÓNICA EN VITAMINA E.

1.1. Producción de leche durante la deficiencia en vitamina E.

La alimentación de las madres con dieta deficiente en vitaminas durante el periodo de lactancia (21 días) reduce el aporte de éstas en la leche materna y acorta el periodo de inducción de deficiencia de vitaminas en las crías (Pasatiempo y cols., 1991).

Para comprobar si la producción de leche y el crecimiento de las crías se vieron afectados por la alimentación materna exenta de vitamina E durante el periodo de la lactancia, se determinaron estos parámetros en el pico de la lactancia (día 12 de la misma). El peso de las crías y la producción de leche materna no se vieron modificados significativamente en el grupo de animales deficientes cuando se compararon los valores obtenidos con los del grupo control.

Producción de leche (mL / cría. día): grupo de animales controles = 4.25 ± 0.10 ; grupo de animales deficientes = 4.60 ± 0.11 (datos expresados como media \pm SEM de tres camadas distintas en cada caso).

1.2. Seguimiento de la ingesta en ratas controles y deficientes en vitamina E.

Se llevó a cabo un seguimiento de la ingesta de los animales desde el destete hasta los 90 días de vida. En la tabla IV.1 se muestra la ingesta de los animales controles y deficientes en vitamina E. La deficiencia no provocó cambios en la ingesta durante el periodo estudiado. La única diferencia en cuanto a la proporción de macro y micronutrientes ingeridos por ambos grupos experimentales es la cantidad de vitamina E ingerida.

Tabla IV. 1. DIETA INGERIDA POR ANIMALES CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

<i>Días de vida</i>	<i>Controles (g/día)</i>	<i>Deficientes en vitamina E (g/día)</i>
21 - 34 días	16.0 ± 0.5 (15)	15.8 ± 0.6 (15)
35 - 48 días	17.0 ± 0.5 (9)	16.5 ± 0.6 (12)
49 - 62 días	17.6 ± 0.3 (14)	17.8 ± 0.5 (20)
63 - 76 días	18.2 ± 0.5 (8)	19.3 ± 0.4 (8)
77 - 90 días	18.2 ± 0.6 (9)	19.6 ± 0.6 (9)

Los datos vienen expresados como media ±SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

1.3. Seguimiento del peso corporal en ratas controles y deficientes en vitamina E.

Igualmente, hicimos un seguimiento del peso corporal de animales controles y deficientes. Tal como se muestra en la tabla IV.2 tampoco se encontraron diferencias significativas en el peso corporal de los animales de ambos grupos experimentales durante todo el periodo que duró el estudio.

Tabla IV. 2. PESO CORPORAL DE ANIMALES CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

<i>Días de vida</i>	<i>Controles (g)</i>	<i>Deficientes en vitamina E (g)</i>
21 - 34 días	83 ± 7 (21)	92 ± 5 (21)
35 - 48 días	166 ± 6 (18)	181 ± 3 (16)
49 - 62 días	235 ± 4 (9)	241 ± 4 (13)
63 - 76 días	297 ± 7 (8)	307 ± 10 (10)
77 - 90 días	342 ± 9 (8)	358 ± 12 (8)

Los datos vienen expresados como media ±SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

1.4. Concentración de tocoferoles más importantes en plasma en ratas controles y deficientes en vitamina E.

Los dos isómeros más importantes de la vitamina E, tanto por su abundancia en la dieta humana como por su actividad biológica son el α - tocoferol en primer lugar y el γ - tocoferol. La interrelación entre estos dos isómeros ha sido ampliamente discutida, mostrando generalmente una relación inversa entre sus concentraciones (Behrens y Madere, 1987; Handelman y cols., 1994; Jiang y cols., 2001).

Llevamos a cabo la medida de ambos vitámeros en animales controles y deficientes, teniendo en cuenta en cualquier caso que la dieta proporcionada a los animales controles contenía α -tocoferol como única forma de vitamina E, siguiendo las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición.

1.4.1. Concentración de α -tocoferol en plasma.

En la tabla IV.3 se muestran los valores de concentración de α -tocoferol en el plasma de animales controles y deficientes en vitamina E. Las ratas alimentadas con dieta exenta de vitamina E (dieta AIN 93-G sin vitamina E) desde el nacimiento – a través de la leche materna- hasta los 90 días de vida, mostraron una concentración plasmática de α -tocoferol que fue disminuyendo progresivamente con el tiempo de ingesta de dieta deficiente, siempre en comparación a sus correspondientes controles según edad.

Al final del periodo estudiado -90 días de edad- los animales deficientes en vitamina E mostraron una concentración plasmática de α -tocoferol menor del 3 % de la concentración obtenida en el grupo control. Si observamos la evolución de la concentración de α -tocoferol en plasma de ratas deficientes durante el tiempo que duró el estudio, comprobamos que el tiempo crítico en el que se produce un fuerte descenso de los niveles de α -tocoferol, y en el que estos difieren significativamente de sus valores control es a 60 días (Figura IV.1). Es interesante señalar que, coincidiendo con lo publicado por otros autores, encontramos una tendencia al aumento de α -tocoferol en plasma con la edad (Parks y Traber, 2000).

Tabla IV. 3. CONCENTRACIÓN DE α -TOCOFEROL EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

<i>Días de vida</i>	<i>CONTROLES (nM)</i>	<i>DEFICIENTES E (nM)</i>	<i>% respecto al control</i>
30 días	23.6 \pm 6.3 (3)	11.8 \pm 0.6 (2)	51.30
50 días	48.1 \pm 7.2 (5)	22.6 \pm 8.6 (3)	46.87
60 días	42.4 \pm 7.7 (3)	2.7 \pm 0.8 (4) *	6.30
90 días	54.8 \pm 9.7 (3)	1.2 \pm 0.3 (3) *	2.21

Los datos están expresados como media \pm SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. Los resultados significativamente distintos de sus respectivos controles están indicados por * ($P < 0.05$).

1.4.2. Concentración de γ -tocoferol en plasma.

Paralelamente a la medida de α -tocoferol en plasma, se llevó a cabo la determinación de su estereoisómero γ -tocoferol. El γ -tocoferol es un estereoisómero del tocoferol cuya actividad es aproximadamente el 30% respecto a la del α -tocoferol (Bieri y Evarts, 1974; Jiang y cols., 2001).

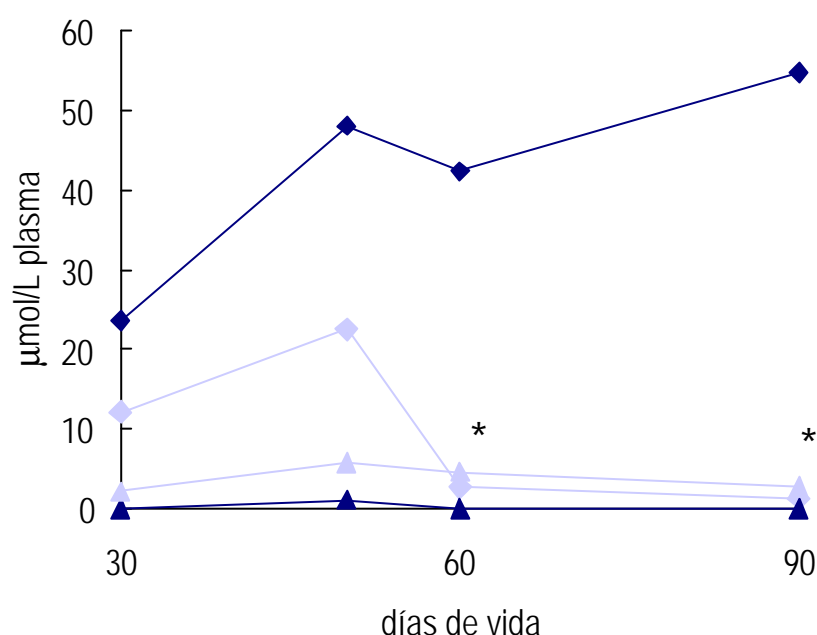
TABLA IV. 4. CONCENTRACIÓN DE γ -TOCOFEROL EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

<i>Días de vida</i>	<i>CONTROLES (nM)</i>	<i>DEFICIENTES (nM)</i>
30 días	ND	2.2 \pm 0.6 (2) *
50 días	1.0 \pm 0.2 (3)	5.8 \pm 1.0 (3) *
60 días	ND	4.6 \pm 1.1 (4) *
90 días	ND	2.8 \pm 0.6 (3) *

Los datos vienen expresados como media \pm SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. Dado que el límite de detección es menor de 0.5 nM, todas las diferencias son estadísticamente significativas. ND: No detectable.

El γ -tocoferol en condiciones normales (controles de cualquier edad) presenta una concentración en suero despreciable sin embargo, en animales alimentados con dieta deficiente en α -tocoferol muestra un aumento en plasma sobre todo a 50 y 60 días de deficiencia (Tabla IV.4; Figura IV.1).

FIGURA IV.1.- CONCENTRACIÓN DE α - y γ - TOCOFEROL EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.



Niveles plasmáticos de vitamina E en ratas controles y deficientes en vitamina E. (◆): α -tocoferol en ratas controles; (◆): α -tocoferol en ratas deficientes; (▲): γ -tocoferol en ratas controles; (▲): γ -tocoferol en ratas deficientes. Los resultados significativamente distintos de sus respectivos controles están indicados por * ($P < 0.05$).

Como se muestra en la representación gráfica (Figura IV.1) en los animales deficientes en vitamina E, bajas concentraciones plasmáticas de α -tocoferol se acompañan de un aumento de la concentración de γ -tocoferol en plasma. Desconocemos su significado fisiológico aunque es interesante resaltar que la dieta utilizada en el

presente estudio contiene como derivado con actividad vitamina E únicamente el α -tocoferol, siguiendo las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición.

En cualquier caso, la suma de la concentración plasmática de ambos vitámeros sigue siendo muy inferior en animales deficientes respecto a los controles.

1.5. Concentración de retinol en plasma.

Llevamos a cabo la medida de otro micronutriente antioxidante liposoluble como es la vitamina A. Numerosos estudios hablan de una interrelación vitamina A/ vitamina E, y de cómo la deficiencia o suplementación de una puede afectar a los niveles plasmáticos de la otra (Xu y cols., 1992; Ametaj y cols., 2000). De hecho, la suplementación con α -tocoferol provoca un ligero descenso del retinol en suero (Willett y cols., 1983).

En nuestro caso, tal como muestra la tabla IV.5, la deficiencia en vitamina E no provocó cambios en los niveles de vitamina A, medidos como retinol –forma mayoritaria en plasma- durante el periodo que duró el estudio.

Tabla IV.5. CONCENTRACIÓN DE RETINOL EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

<i>Días de vida</i>	<i>CONTROLES (nM)</i>	<i>DEFICIENTES E (nM)</i>	<i>% respecto al control</i>
30 días	2.3 \pm 0.6 (3)	2.1 \pm 0.6 (2)	90.39
50 días	3.0 \pm 0.6 (5)	2.7 \pm 0.9 (3)	90.60
60 días	2.0 \pm 0.2 (5)	2.0 \pm 0.2 (5)	99.51
90 días	2.1 \pm 0.2 (8)	1.9 \pm 0.3 (6)	88.10

Los datos están expresados como media \pm SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

1.6. Determinación de parámetros fisiopatológicos en plasma.

Como parte del establecimiento del modelo de deficiencia en vitamina E, llevamos a cabo la medida de determinados parámetros fisiopatológicos, concretamente de aquellos que están más relacionados con lo que posteriormente será objeto de nuestro estudio.

Como ya hemos dicho anteriormente la deficiencia en vitamina E no provocó un cambio significativo en el peso de las ratas. Del mismo modo, el peso del hígado tampoco se vio afectado significativamente por esta situación al final del período de estudio (Peso hepático (g): control = 10.80 ± 0.94 ; deficiente = 11.25 ± 0.76 ; datos expresados como media \pm SEM de 4 animales utilizados en cada caso).

En animales deficientes en vitamina E observamos un aumento de la concentración de triacilgliceroles y colesterol en plasma. Este incremento ya ha sido descrito por otros autores, en modelos de deficiencia en vitamina E en ratas (Chen y cols., 1972; Yasuda y cols., 1979; Kaseki y cols., 1986), así como en otras especies animales (Morgulis y Spencer, 1936; Orinari y cols., 1985).

Pal y cols. (2003) han observado, trabajando con células hepáticas HepG2, que la administración de α -tocoferol -pero no de otros tocoferoles- provoca un aumento de la expresión del receptor de las LDL en el hígado (mRNA y proteína) al menos hasta una concentración determinada de α -tocoferol ($50 \mu\text{M}$). A partir de esta concentración, el efecto se revierte. Estos autores concluyen que este hecho podría explicar los elevados niveles de colesterol encontrados en animales deficientes en vitamina E, y el hecho de que éstos vuelvan a la normalidad tras la administración de una cantidad adecuada de α -tocoferol.

Hay que tener en cuenta, además, que el α -tocoferol actúa a otros niveles en la regulación del colesterol, por ejemplo a través de la activación de la HMG-coA reductasa, en un mecanismo también dependiente de concentración. Se ha observado que la deficiencia en vitamina E provoca un aumento de la síntesis de colesterol hepático y un descenso de su catabolismo (Eskelson y cols., 1973; Chupukcharoen y cols., 1983).

Tabla IV.6. PARÁMETROS FISIOPATOLÓGICOS EN PLASMA DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

Plasma	60 días		90 días	
	Control	Deficiente	Control	Deficiente
Peso corporal (g)	235 ± 4 (9)	241 ± 4 (13)	342 ± 9 (8)	359 ± 12 (8)
Colesterol total (mg/dL)	55 ± 9 (3)	66 ± 2 (4)	46 ± 3 (3)	59 ± 3 (4) *
Triacilgliceroles (mg/dL)	47 ± 10 (4)	85 ± 4 (4) *	40 ± 4 (3)	64 ± 5 (4) *
AST (UI/L)	36 ± 4 (3)	36 ± 3 (5)	37 ± 2 (5)	64 ± 9 (6)*
ALT (UI/L)	13.2 ± 0.4 (3)	14.2 ± 2.9 (4)	19.9 ± 1.5 (4)	25.1 ± 5.2 (4)
CK (UI/L)	120 ± 20 (2)	186 ± 2 (2)	121 ± 9 (3)	178 ± 19 (3)
MDA (μM)	3.5 ± 0.2 (4)	3.4 ± 0.5 (5)	2.9 ± 0.5 (4)	2.9 ± 0.5 (4)

Los datos vienen expresados como media \pm SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. Los resultados significativamente distintos de sus respectivos controles están indicados por * ($P < 0.05$).

En cualquier caso conviene señalar que el incremento de triacilgliceroles y colesterol en plasma no se acentúa al incrementarse el periodo de deficiencia, lo que podría dar lugar a pensar en la puesta en marcha de mecanismos compensadores.

Como marcador de daño hepático, llevamos a cabo la medida de las aminotransferasas plasmáticas. A los 90 días de deficiencia se observa un aumento de la AST. Las aminotransferasas se encuentran incrementadas en gran medida en las alteraciones hepáticas agudas, como las producidas por virus, mientras que los trastornos hepáticos crónicos se caracterizan por un aumento más ligero, como ocurre en nuestro caso. Estos resultados son coincidentes con los de Barrow y cols. (1992) que también encuentran un ligero aumento de la AST, en la deficiencia en vitamina E. En determinadas patologías hepáticas, como son la hepatitis C (Mahmood y cols., 2003) o en esteatohepatitis no alcohólica (Yoneda, y cols., 2004) se ha visto que la administración de vitamina E reduce los niveles de ALT, que aunque aumenta ligeramente en el grupo de animales deficientes en vitamina E, los resultados no son significativamente diferentes de los encontrados en el grupo control.

También llevamos a cabo la medida de la actividad CK como marcador del daño muscular, que es según los estudios realizados por diversos autores, uno de los órganos más dañados en esta deficiencia (Rafique y cols., 2001; Coombes y cols., 2002). El cambio no fue significativo.

Por otra parte, en nuestro modelo, los niveles plasmáticos de MDA, marcador de peroxidación lipídica, no se vieron alterados por la deficiencia en vitamina E.

Por tanto, como podemos observar, se producen diversas alteraciones de parámetros bioquímicos en los animales deficientes en vitamina E. Si bien, conviene destacar que los animales no mostraron una sintomatología aparente de enfermedad, ni se apreciaron alteraciones físicas apreciables durante el periodo que duró el estudio.

2. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO PRODUCIDO POR LA DEFICIENCIA CRÓNICA DE VITAMINA E.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, numerosos trastornos hepáticos cursan con deficiencia en vitamina E (von Herbay y cols., 1994; Look y cols., 1999; Shirahata, 1999; Kim y cols., 2000). A pesar de este hecho, poco se conoce sobre los efectos que la deficiencia genera en este tejido.

Nos propusimos valorar en primer lugar el grado de estrés oxidativo que la deficiencia en vitamina E provoca en el hígado. Para ello determinamos en el hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E los niveles de α -tocoferol, glutatión así como la producción de lipoperóxidos.

2.1. Niveles hepáticos de α -tocoferol en ratas controles y deficientes en vitamina E.

Con anterioridad a la determinación del grado de estrés oxidativo hepático producido por la deficiencia en vitamina E, el primer paso es corroborar que la deficiencia sistémica de vitamina E, definida por los bajos niveles plasmáticos de ésta, se traduce también en un descenso significativo de la vitamina E -concretamente del α -tocoferol- en el hígado. Para ello determinamos la concentración hepática de α -tocoferol a los 60 y 90 días de deficiencia.

Como se puede observar en la tabla IV.7 en ratas deficientes se produce un descenso significativo de la concentración hepática de vitamina E, siendo éste más acusado al aumentar el periodo de deficiencia, alcanzando niveles de un 10% del valor control a los 90 días de deficiencia.

2.2. La deficiencia en vitamina E provoca una alteración del cociente GSSG/GSH en hígado total.

Uno de los parámetros más representativos del estrés oxidativo hepático son los niveles de glutatión oxidado y reducido, así como el cociente entre ambos (Meister, 1988; De Leve y Kaplowitz, 1991). Llevamos a cabo su determinación en hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E.

Como se muestra la tabla IV.7, la deficiencia en vitamina E durante 90 días induce un descenso significativo de los niveles de glutatión reducido, que además se acompaña de un aumento del GSSG, si bien, este último dato no resultó significativo.

La determinación del cociente GSSG /GSH nos aporta una información más completa del estado redox celular. Observamos un incremento significativo del cociente en ratas deficientes en vitamina E a los 90 días de tratamiento, demostrando así una oxidación del glutatión total del hígado, que es un proceso característico del estrés oxidativo.

2.3. La deficiencia en vitamina E provoca un incremento de la concentración de MDA en hígado total.

Llevamos a cabo la determinación de la peroxidación lipídica presente en el hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E, mediante la cuantificación por HPLC de los niveles de malondialdehído (MDA).

Observamos un importante aumento de los niveles de MDA a los 60 días de deficiencia y este incremento se vuelve espectacular a los 90 días de deficiencia, alcanzando una media de hasta 15 veces el valor control (Tabla IV.7) Este dato no es tan sorprendente si tenemos en cuenta que la principal acción antioxidante de la vitamina E se desarrolla sobre los lípidos impidiendo la peroxidación de estos, y actuando como estabilizante de membranas biológicas. La vitamina E ha sido definida como un antioxidante universal en la defensa de la oxidación de las membranas biológicas, ya que actúa en todas las etapas del daño oxidativo de membranas (Evstigneeva y cols., 1998).

Tabla IV.7. NIVELES DE α -TOCOFEROL, GLUTATIÓN Y MDA EN HÍGADO DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

Hígado	60 días		90 días	
	CONTROL	DEFICIENTE	CONTROL	DEFICIENTE
α-tocoferol (μg / g hígado)	24.7 ± 1.9 (4)	4.7 ± 0.4 (5)*	31.1 ± 5.5 (3)	3.2 ± 0.5 (3)*
GSH (μmol / g hígado)	6.6 ± 0.2 (4)	6.6 ± 0.2 (5)	6.9 ± 0.2 (7)	5.7 ± 0.3 (8)*
GSSG (nmol/ g hígado)	85 ± 19 (4)	126 ± 15 (6)	80 ± 20 (4)	128 ± 15 (5)
GSSG/GSH x 100	1.5 ± 0.2 (3)	1.9 ± 0.2 (4)	0.8 ± 0.1 (3)	2.2 ± 0.4 (5)*
MDA (nmol/g hígado)	28 ± 11 (3)	115 ± 19 (3)*	42 ± 12 (3)	620 ± 190 (3)*

*Datos expresados como media \pm SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. Los resultados significativamente distintos de sus respectivos controles están indicados por * ($P < 0.05$).*

2.4. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre el estrés oxidativo mitocondrial hepático.

La mitocondria es un orgánulo altamente susceptible al ataque por radicales libres (Kowaltowsky y Vercesi, 1999), entre otras razones por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, su alto consumo de oxígeno y su baja capacidad antioxidante. Por esta razón, nos propusimos estudiar en qué medida había estrés oxidativo mitocondrial como consecuencia de la deficiencia en vitamina E. Para ello, valoramos los niveles de GSH, GSSG y MDA mitocondriales en hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E.

Tal como se muestra en la tabla IV. 8, encontramos un descenso del GSH mitocondrial (más acusado que en el caso del tejido completo), si bien este descenso no se vio acompañado de un aumento del GSSG, de forma que podemos concluir que hay un descenso del glutatión mitocondrial total.

Al igual que en hígado total, los niveles de MDA también se encuentran elevados significativamente en las mitocondrias hepáticas de ratas deficientes en vitamina E.

TABLA IV.8. NIVELES DE GLUTATIÓN Y MDA EN MITOCONDRIAS HEPÁTICAS DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.

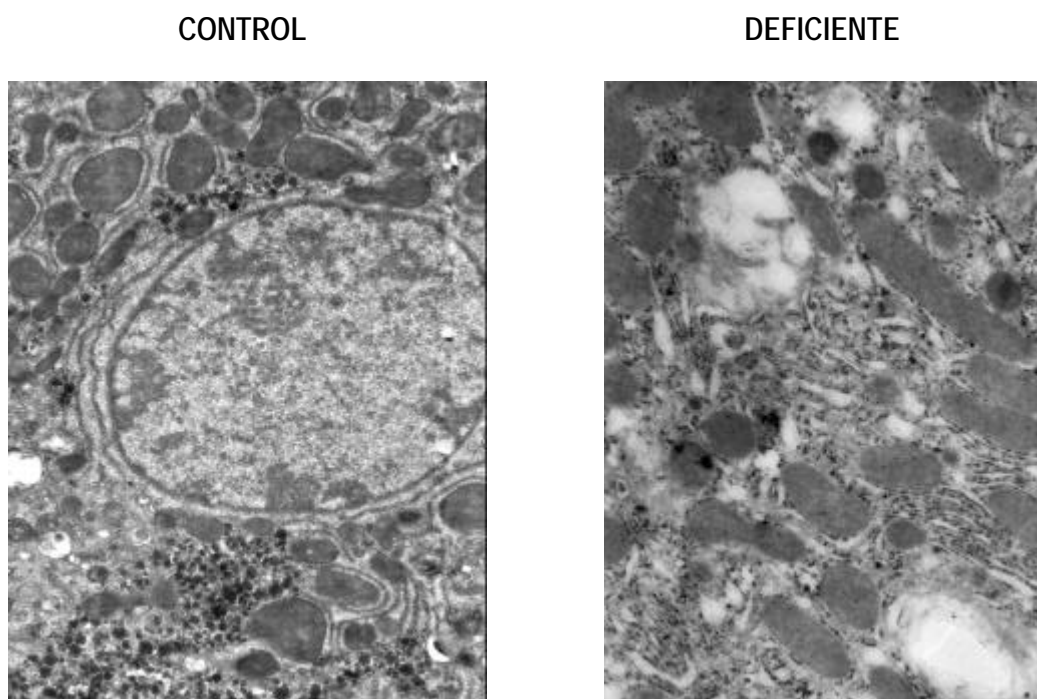
<i>Mitocondria hepática</i>	<i>60 días</i>		<i>90 días</i>	
	CONTROL	DEFICIENTE	CONTROL	DEFICIENTE
GSH (nmol/ mg proteína)	7.6 ± 0.4 (2)	5.3 ± 0.5 (3)*	7.8 ± 0.4 (5)	4.5 ± 0.4 (7)*
GSSG (nmol/ mg proteína)	0.38 ± 0.08 (4)	0.37 ± 0.14 (5)	0.33 ± 0.06 (3)	0.22 ± 0.05 (4)
MDA (nmol/ mg proteína)	2.9 ± 0.3 (4)	6.7 ± 0.8 (5)*	1.6 ± 0.5 (4)	8.7 ± 1.2 (3)*

*Datos expresados como media ± SEM. Entre paréntesis se muestra el número de animales utilizados. . Los resultados significativamente distintos de sus respectivos controles están indicados por * (P<0.05).*

3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E EN LA ULTRAESTRUCTURA HEPÁTICA.

Con el fin de analizar los posibles cambios que la deficiencia en vitamina E podía producir en la estructura del tejido hepático, se observaron secciones ultrafinas de hígado procedente de animales controles y deficientes en vitamina E a microscopía electrónica, no encontrándose cambios destacables de la ultraestructura hepática (ver Figura IV.2)

FIGURA IV.2. ULTRAESTRUCTURA HEPÁTICA POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.



Estudio mediante microscopía electrónica de la ultraestructura hepática. Se muestra un ejemplo de una sección de hígado observada al microscopio electrónico (x13100 aumentos) de ratas controles y deficientes en vitamina E de 90 días. No existen diferencias en la ultraestructura hepática entre ambos grupos experimentales.

4. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA HEPÁTICA.

La alteración del estado redox de la célula modifica funciones celulares esenciales como la expresión génica (Arrigo, 1999) (ver Introducción, apartado 1.3.1. Efecto de los radicales libres en la regulación génica). Así mismo, en los últimos años se ha comprobado que la vitamina E puede controlar la expresión de varios genes involucrados en la respuesta al estrés (Davies, 1999), así como de otros implicados en otros procesos de proliferación celular y apoptosis (Ricciarelli y cols., 2001).

Por ello, mediante RT-PCR analizamos la expresión diferencial en animales controles y deficientes en vitamina E de genes relacionados con las alteraciones observadas previamente, genes sensibles al estado redox celular hepático como son los que codifican las dos subunidades que forman la γ -GCS y el gen que codifica la UCP2.

Además, como se ha comentado anteriormente (ver Introducción, apartado 1.3. Estrés oxidativo y regulación génica), el estrés oxidativo puede inducir la expresión de genes implicados en la proliferación celular. Por ello, llevamos a cabo el análisis de la expresión de genes implicados en este proceso como son *ciclina D1*, *ciclina E*, *p21* o *c-jun*.

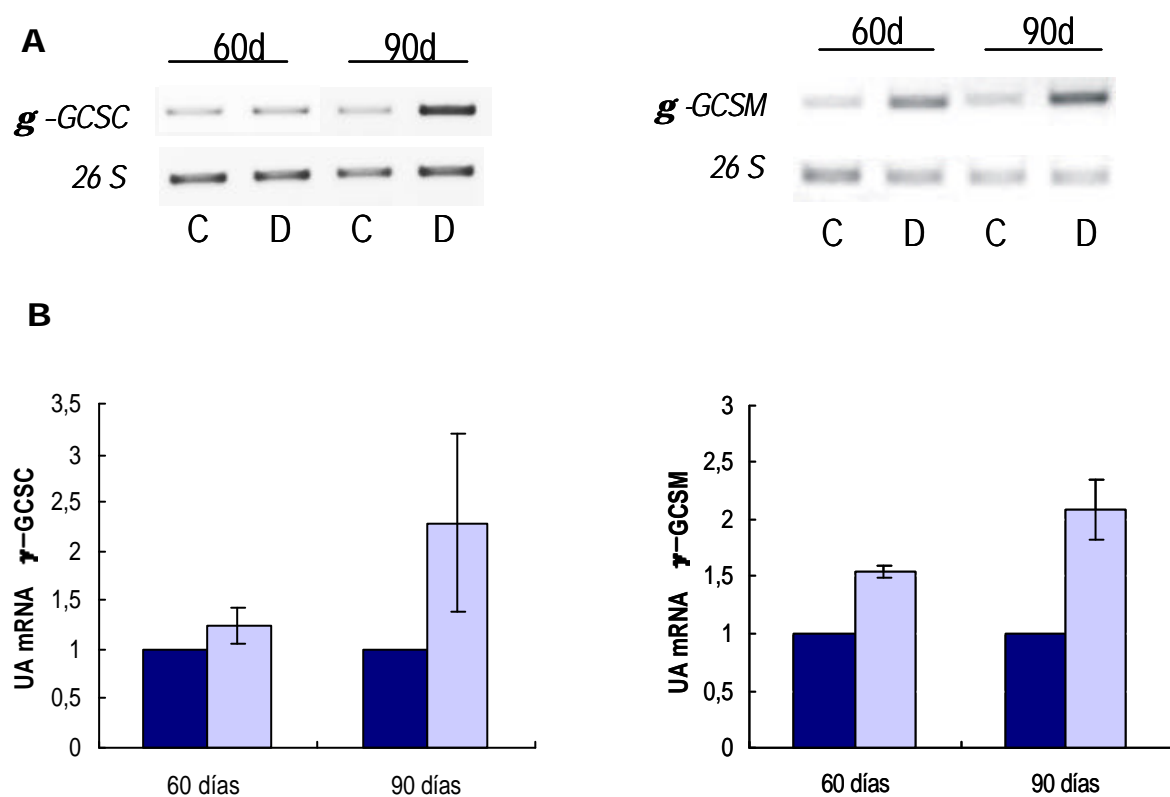
4.1. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de los genes γ -GCSC y γ -GCSM.

Como se ha descrito en el apartado 2, en animales deficientes en vitamina E encontramos un descenso de los niveles de GSH tanto mitocondrial como total. Por esta razón, llevamos a cabo el estudio, mediante la técnica de RT-PCR, de la expresión de los genes que codifican la subunidad catalítica (γ -GCSC) y la subunidad reguladora (γ -GCSM) que forman la γ -glutamylcisteína-sintetasa, enzima limitante en la síntesis de glutatión.

Como se puede observar en la figura IV.3 los animales deficientes en vitamina E presentan un aumento en el nivel en el estado estacionario del mRNA de ambos genes frente a sus respectivos controles y este incremento se vuelve más acusado con el tiempo de deficiencia.

El aumento de expresión de esta enzima tiene lugar en diversas condiciones que provocan estrés oxidativo, como respuesta al descenso de los niveles celulares de GSH (Lu, 1999).

FIGURA IV.3. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *gGCSC* y *gGCSM*.



A. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los genes *gGCS* subunidad catalítica (*gGCSC*) y reguladora (*gGCSM*) de animales controles (C) y deficientes en vitamina E (D).

B. Densitometrado de las RT-PCR de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm SEM. Los datos se obtuvieron utilizando el cociente de la intensidad de cada banda respecto a su control interno 26S. ■ : control, □ : deficiente en vitamina E

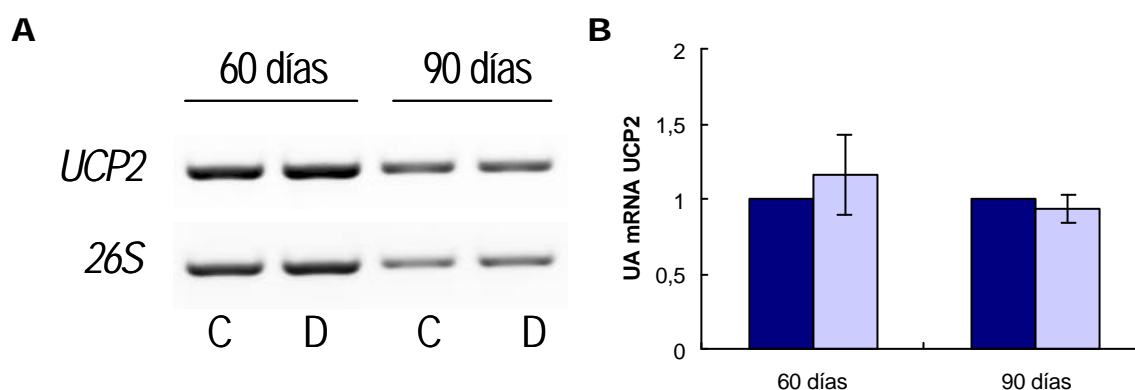
4.2. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de los genes de las proteínas desacopladoras de la fosforilación oxidativa (UCPs).

Durante la respiración, una pequeña proporción de las moléculas de oxígeno se convierten en radicales superóxido ($O_2^{\cdot -}$), mediante la reducción monovalente del O_2 . El desacoplamiento de la respiración representa un sistema importante para la limitación de producción de ROS, y en este sentido una de las funciones de las proteínas desacopladoras de la respiración (UCP) podría ser la limitación de síntesis de ROS (Ricquer y Bouilland, 2000).

Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de UCP2 en el hígado.

El gen *UCP2* codifica una proteína, de distribución ubicua, que está considerada como un regulador de la producción de H_2O_2 mitocondrial. Decidimos determinar si su expresión se alteraba en el hígado de animales deficientes, como respuesta al estrés oxidativo causado por esta carencia nutricional. Como se puede observar en la Figura IV.4, no se encontró alteración de la expresión de *UCP2* en animales deficientes respecto de los controles.

FIGURA IV.4 EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *UCP2* EN HÍGADO.



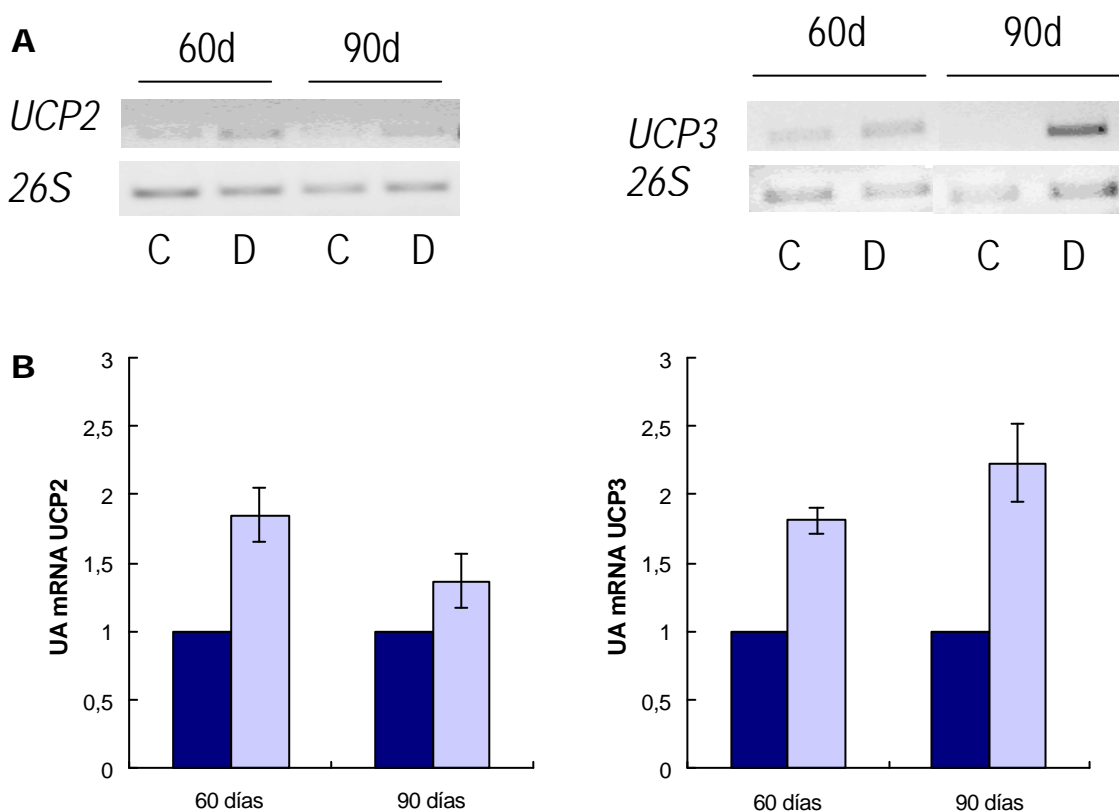
A. Análisis por RT-PCR de la expresión del gen *UCP2* en hígado de animales controles (C) y deficientes en vitamina E (D).

B. Densitometrado de las RT-PCR de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media SEM. Los datos se obtuvieron utilizando el cociente de la intensidad de cada banda respecto a su control interno 26S. ■ : control, □ : deficiente en vitamina E.

Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de UCP2 y UCP3 en músculo gastrocnemius.

Numerosos trabajos muestran que el músculo es un tejido más vulnerable al daño oxidativo provocado por la deficiencia en vitamina E que el hígado (Rafique y cols., 2001; Coombes y cols., 2002), debido en parte a la amplia gama de sistemas antioxidantes y mecanismos de defensa de que dispone el hígado (Rafique y cols., 2001). Decidimos analizar en el músculo la expresión de *UCP2*, la cual no encontramos alterada en el hígado de animales deficientes. Como podemos observar en la figura IV.5, en este caso sí se produce un incremento de la expresión de *UCP2* en animales deficientes.

FIGURA IV.5. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *UCP2* Y *UCP3* EN MÚSCULO.



A. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los genes *UCP2* y *UCP3* de animales controles (C) y deficientes en vitamina E (D).

B. Densitometrado de las RT-PCR de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm SEM. Los datos se obtuvieron utilizando el cociente de la intensidad de cada banda respecto a su control interno 26S. ■ : control, □ : deficiente en vitamina E.

En el caso del músculo, se encuentra un homólogo de la UCP, la UCP3, específico de este tejido. Recientemente, ha sido discutida de forma extensiva la función fisiológica de las UCPs en la mitocondria del músculo esquelético (Tonkonogi y cols., 2003). Una de las hipótesis es que la proteína UCP3 puede prevenir la excesiva producción de ROS en la membrana mitocondrial. Esta hipótesis viene avalada por experimentos con ratones *knock-out* de la UCP3 (*UCP3^{-/-}*) en los que se produjo un aumento de los ROS mitocondriales del músculo esquelético (Brand y cols., 2002).

Decidimos analizar la posible alteración de su expresión en animales deficientes en vitamina E. Como se muestra en la figura IV.5, los animales deficientes en vitamina E muestran un incremento de la expresión de *UCP3* en el músculo.

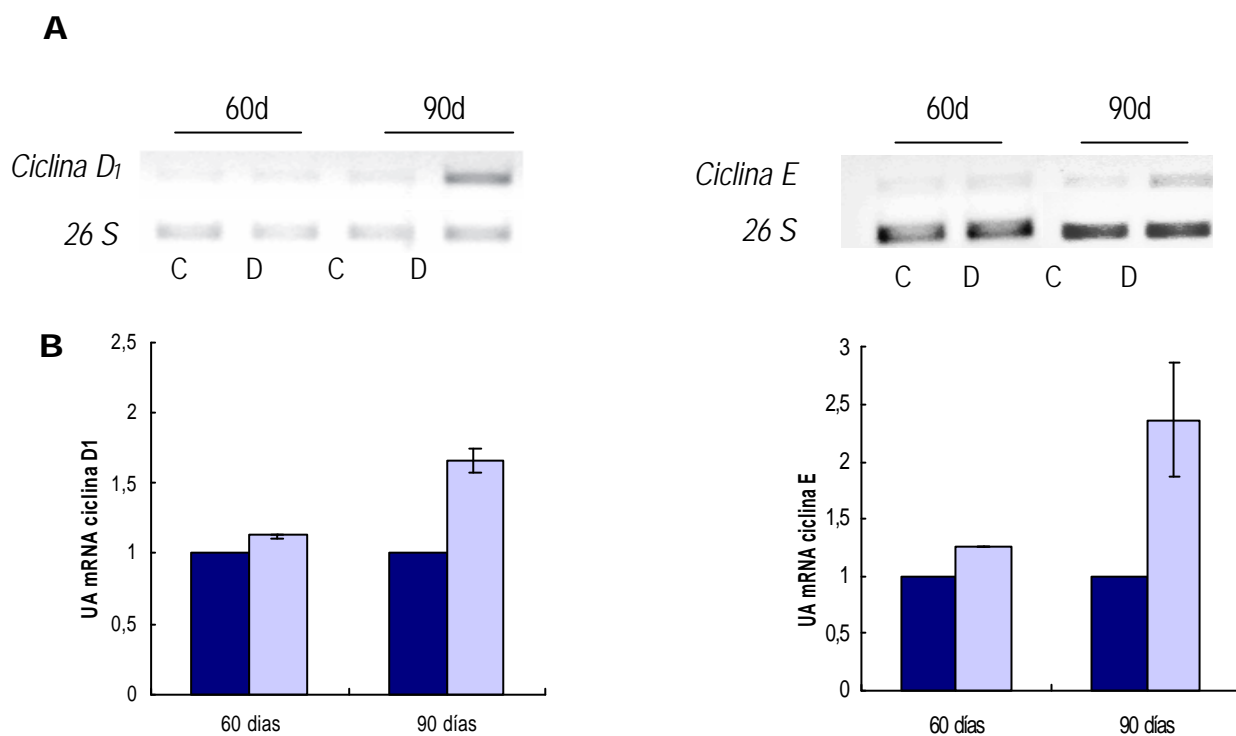
4.3. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de las ciclinas y de sus inhibidores.

A la vitamina E se le han atribuido propiedades anticancerígenas. Su acción antioxidante proporciona una defensa efectiva para evitar la oxidación del DNA que podría conducir a mutagénesis (Ramirez-Tortosa y cols., 2001; Brigelius-Flohé y cols., 2002). Además, el α -tocoferol tiene importantes propiedades antiproliferativas (Azzi y cols., 2000; Sylvester y cols., 2001); así mismo, su deficiencia provoca un incremento de la proliferación en tejido neuronal (Ciaroni y cols., 2002; Cecchini y cols., 2003) por mecanismos que no están totalmente esclarecidos.

Por ello, decidimos estudiar el efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de los genes que codifican *ciclina D1* y *ciclina E*, genes cuya expresión se encuentra además regulada por el estrés oxidativo. Para ello realizamos por RT-PCR el análisis del mRNA de estos dos genes, del hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E.

Como se muestra en la figura IV.6, en el hígado de las ratas deplecionadas de vitamina E se produce un incremento de los niveles de mRNA en estado estacionario de ambos genes.

FIGURA IV.6. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *CICLINA D1* Y *CICLINA E*.

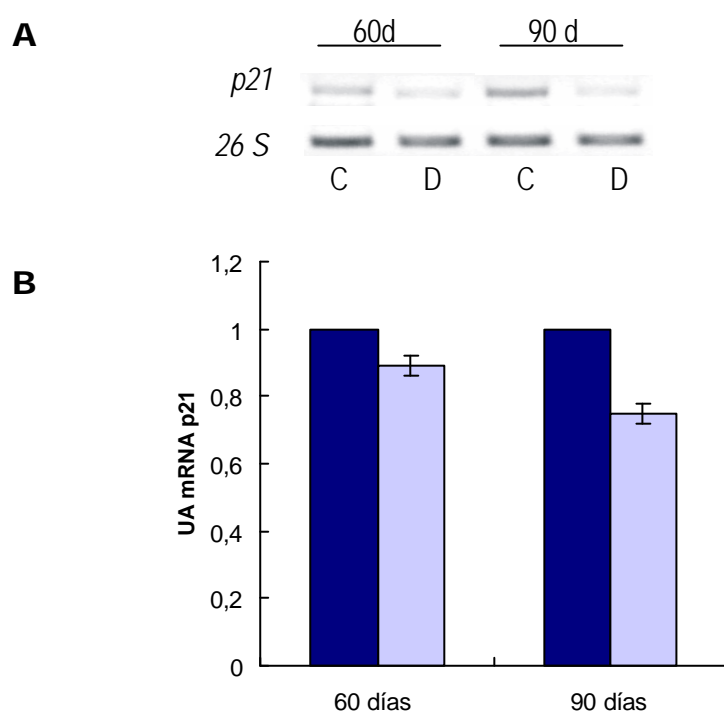


A. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de los genes ciclina D1 y ciclina E de animales controles (C) y deficientes en vitamina E (D).

B. Densitometrado de las RT-PCR de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm SEM. Los datos se obtuvieron utilizando el cociente de la intensidad de cada banda respecto a su control interno 26S. ■: control, □: deficiente en vitamina E.

Las ciclinas funcionan como subunidades reguladoras de unos complejos enzimáticos que forman con las quinasas ciclin-dependientes (CDK), controlando así la progresión mediante puntos de control del ciclo celular, por fosforilación e inactivación de sustratos diana (Joyce y cols., 2001). En animales deficientes en vitamina E encontramos un descenso de la expresión del gen *p21*, que codifica una proteína que actúa inhibiendo la actividad de los complejos ciclina E (D) / CDK, siendo esencial para mantener a la célula detenida en la fase G1 (figura IV.7).

FIGURA IV.7 EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *p21*.



A. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión del gen *p21* de animales controles (C) y deficientes en vitamina E (D).

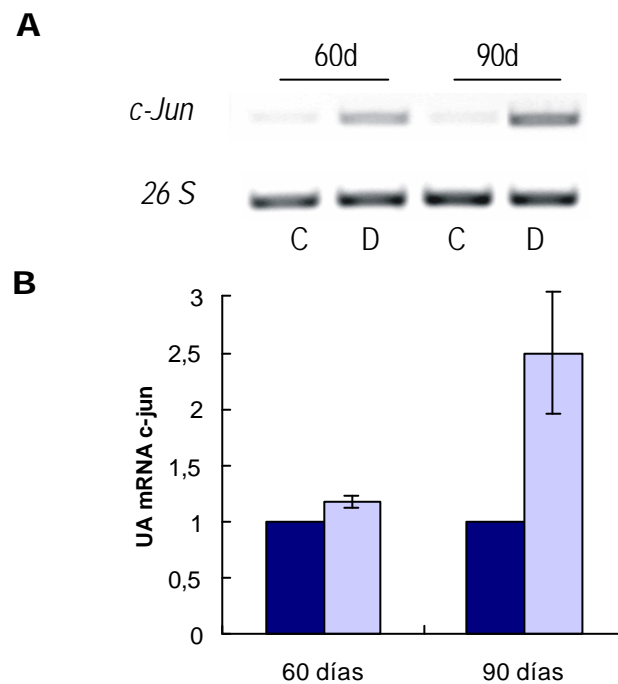
B. Densitometrado de las RT-PCR de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm SEM. Los datos se obtuvieron utilizando el cociente de la intensidad de cada banda respecto a su control interno 26S. ■: control, □: deficiente en vitamina E.

4.4. Efecto de la deficiencia en vitamina E sobre la expresión de *c-jun*.

c-jun, que codifica uno de los componentes de la proteína AP-1, es un gen cuya regulación transcripcional tiene un papel fundamental en la respuesta al daño hepático (Jones y Czaja, 1998). Así mismo, actúa como regulador positivo de proliferación celular y progresión de fase G1 a S, mediante un mecanismo que implica un control transcripcional directo sobre el gen de *ciclina D1* (Wisdom y cols., 1999).

Llevamos a cabo el análisis de expresión diferencial del oncogen *c-jun*, encontrándonos un incremento de los niveles de mRNA de *c-jun* proporcional al tiempo de deficiencia en vitamina E (Figura IV.8).

FIGURA IV.8 EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *c-jun*.



A. Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión del gen *c-jun* de animales controles (C) y deficientes en vitamina E (D).

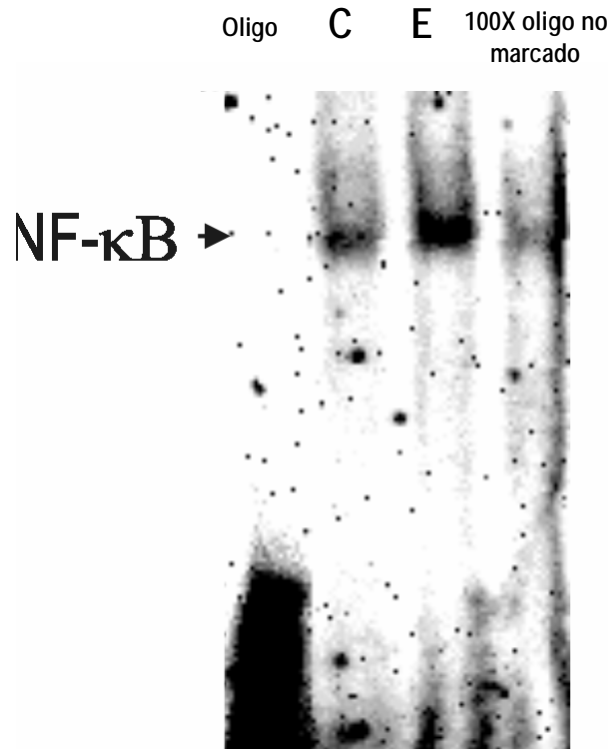
B. Densitometrado de las RT-PCR de 3 experimentos independientes. Los datos se expresan como media \pm SEM. Los datos se obtuvieron utilizando el cociente de la intensidad de cada banda respecto a su control interno 26S. ■ : control, □ : deficiente en vitamina E.

5. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B EN EL HÍGADO.

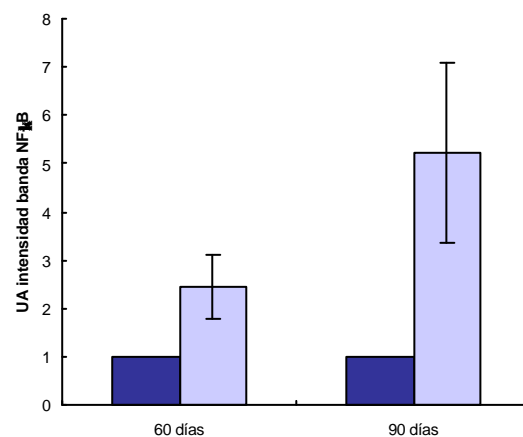
El incremento de MDA –tanto en mitocondrias como en hígado completo- así como el descenso en hígado del cociente GSH/GSSG que encontramos en ratas deficientes en vitamina E indican estrés oxidativo hepático. Así mismo, en estos animales hemos encontrado alterada la expresión de determinados genes, entre los que se encuentran *gGCS* (ambas subunidades), *ciclina D1*, *ciclina E* o *p21*. Los mecanismos moleculares por los cuales el estado redox de la célula altera la transcripción de genes específicos eucariotas es complejo y poco conocido (Arrigo, 1999). De entre los factores de transcripción sensibles al estado redox, NF- κ B tiene un papel esencial en estos procesos, constituyendo el paradigma de factor de transcripción sensible al estado redox, al jugar un papel crítico como mediador en la respuesta al estrés oxidativo (Mercurio y Manning, 1999). Además, concretamente la regulación de la expresión de genes como *gGCSC*, *gGCSM* o *ciclina D1* ha sido relacionada con este factor de transcripción, ya que en su promotor se encuentra la secuencia consenso de NF- κ B, lo que permitiría un control transcripcional de dicho factor de transcripción sobre ellos. Todos estos datos plantean la hipótesis de que NF- κ B este participando de forma activa en este proceso de estrés oxidativo inducido por una disminución de los niveles de vitamina E.

Con el propósito de determinar su posible activación en este modelo de daño hepático, se realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSA) y para ello procedimos de la siguiente manera: obtuvimos extractos nucleares de hígado de ratas controles y deficientes en vitamina E de 90 días y los sometimos al ensayo de retraso de movilidad en gel usando oligonucleótidos que contienen la secuencia consenso de NF- κ B. Tal como se muestra en la figura IV.9.A, en el hígado de animales deficientes en vitamina E se produce un incremento de la actividad de unión de NF- κ B. La especificidad de la unión de NF- κ B se demuestra al comprobar que la banda desaparece al añadir oligo competidor no marcado con la secuencia de reconocimiento de NF- κ B.

FIGURA IV. 9. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E EN LA ACTIVIDAD DE UNIÓN DE NF- κ B AL DNA MEDIANTE ANÁLISIS POR EMSA.



A) Fotografía del análisis del retraso en gel (EMSA). Se incubaron extractos nucleares de hígado de ratas de 90 días controles (C) y deficientes en vitamina E (E) con oligonucleótidos marcados con digoxigenina que contienen la secuencia consenso de NF- κ B y se sometieron a análisis por EMSA. La especificidad de la unión se ensayó por competición con un exceso 100X molar del oligonucleótido específico no marcado.



B) Densitometrado del análisis por EMSA. Los datos se expresan como media \pm SEM \times 3 parejas de animales controles (■) y deficientes en vitamina E (□).

Además se realizó un densitometrado de la banda correspondiente a la unión NF- κ B –oligonucleótido perteneciente a los extractos nucleares de hígado de al menos 3 animales diferentes de cada caso -controles y deficientes de 60 y 90 días- (fig. IV.9.B) Como podemos observar se produce un incremento de la actividad de unión de NF- κ B, que se vuelve más acusada al incrementarse el tiempo de deficiencia en vitamina E.

6. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA γ -GCS.

La γ -GCS es la enzima limitante en la síntesis de GSH. Su expresión basal se ve alterada por numerosas situaciones, entre ellas el estrés oxidativo, cuyo estudio ha sido ampliamente desarrollado por numerosos autores (Lu, 1999). A pesar de esto, poco se conoce de los mecanismos directos implicados en su regulación.

En nuestro modelo de estrés oxidativo, hemos encontrado en el hígado de los animales deficientes un cambio en la expresión de los genes que codifican las dos subunidades de la enzima γ -GCS, así como una activación del factor de transcripción NF- κ B. Los genes que codifican ambas subunidades de la enzima γ -GCS (*γ GCSC* y *γ GCSM*) poseen en sus promotores secuencias de unión específicas para NF- κ B (Yang y cols., 2001a; 2001b). Por todo esto, se propuso determinar la implicación de NF- κ B en la regulación de la transcripción de ambos genes en la deficiencia en vitamina E.

Con el fin de seguir ahondando en los mecanismos responsables del control transcripcional de la γ -GCS decidimos estudiar, también, la posible intervención de c-Jun en este mecanismo. Así mismo, quisimos comprobar si la posible unión de estos factores de transcripción al promotor se traducía en una regulación transcripcional activa.

6.1. Inmunoprecipitación de los complejos NF- κ B – DNA.

Para intentar determinar el mecanismo responsable del incremento de expresión de los genes que codifican la γ -GCS subunidad catalítica y γ -GCS subunidad reguladora, estudiamos la posible unión de NF- κ B al promotor de estos genes. Para ello

empleamos la inmunoprecipitación del complejo NF- κ B -DNA, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a NF- κ B (p65).

Se extrajo el DNA de las fracciones Input, Unido y Sin anticuerpo; se analizaron cantidades iguales de cada fracción, usando oligonucleótidos que amplificasen la región promotora del gen de interés, concretamente la región de -181 a -478 desde el inicio de la traducción del gen de la γ -GCSC, y de -244 a -651 del gen de la γ -GCSM [ver Sección Material y Métodos. 11. Inmunoprecipitación de fragmentos de cromatina (*ChIP assay*)]. El DNA amplificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

Tal como se muestra en la figura IV.10.A, en ratas con una deficiencia en vitamina E de 60 días, encontramos una banda correspondiente a la unión de NF- κ B al promotor del gen *gGCSC* subunidad catalítica, que en el caso de animales controles en las mismas condiciones es prácticamente indetectable. Este resultado se repite a los 90 días de deficiencia (figura IV.10.B). Este mismo proceso tiene lugar en el caso del promotor del gen *gGCSC* subunidad reguladora. Como control negativo, se analizó la unión de NF- κ B al promotor de la α -actina, gen cuya expresión no está regulada por NF- κ B. Como podemos observar en la figura, en este caso no existe unión de NF- κ B al promotor, tanto en ratas controles como deficientes en vitamina E.

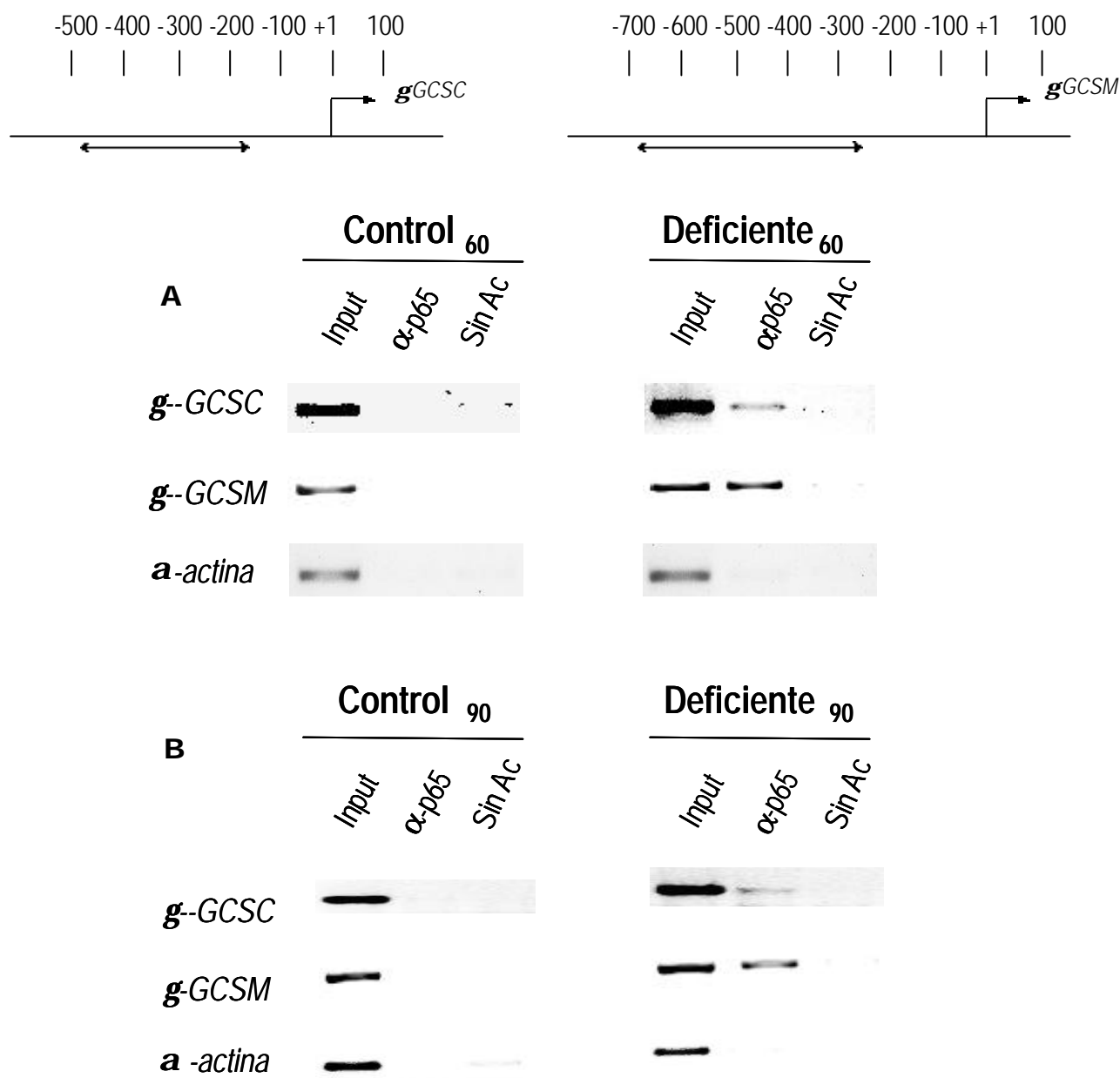
Estos resultados parecen indicar que en ratas deficientes en vitamina E existe un control transcripcional de NF- κ B sobre ambos genes.

6.2. Inmunoprecipitación de los complejos AP-1 – DNA.

Al igual que ocurre con NF- κ B, en el promotor de los genes que codifican las dos subunidades de la γ -GCS se encuentran secuencias de unión específicas para AP-1 (Yang y cols., 2001a; 2001b).

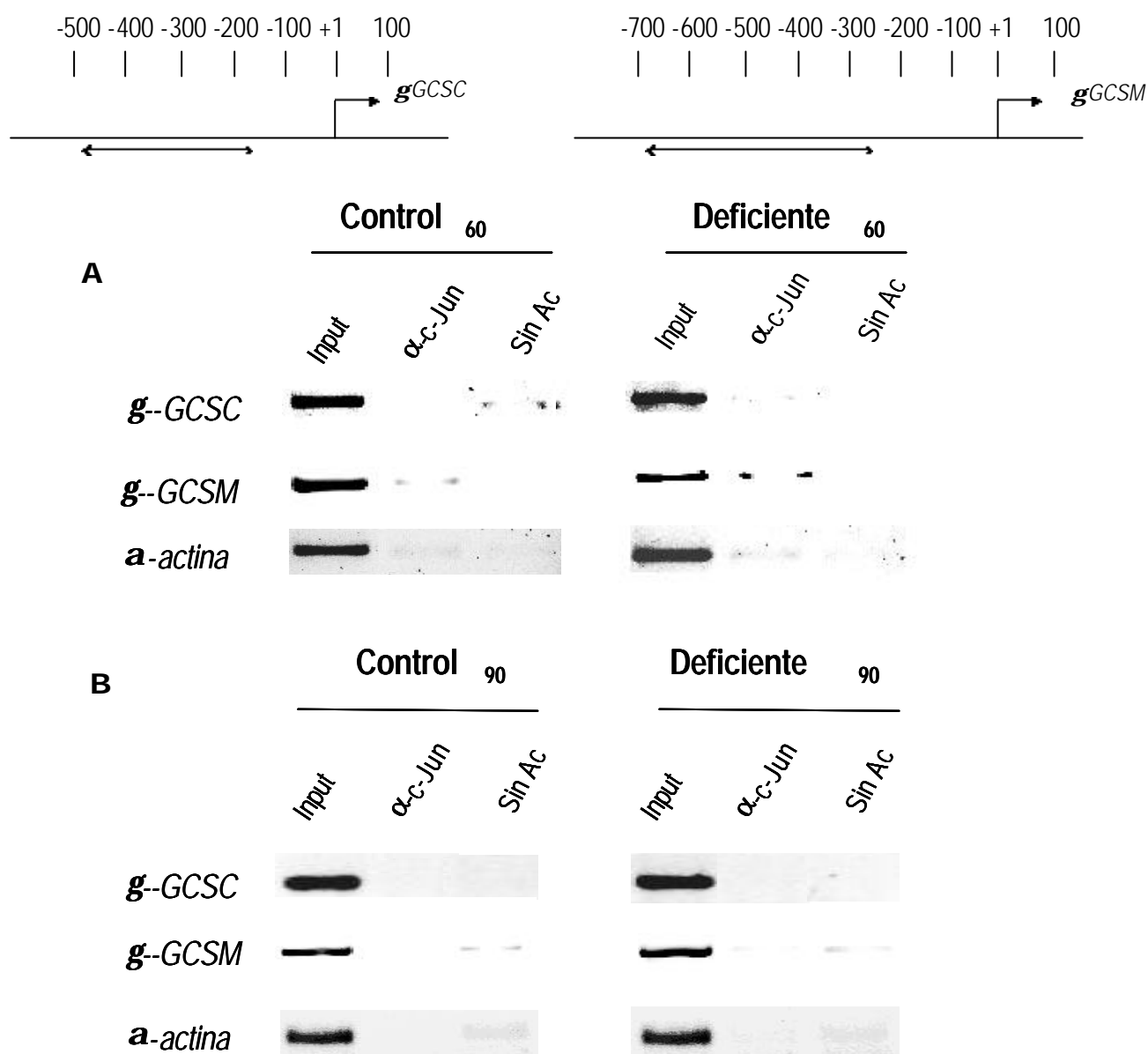
Decidimos analizar la posible unión de c-jun al promotor de estos genes. Para ello empleamos la inmunoprecipitación del complejo AP-1 -DNA, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a c-jun.

Figura IV. 10. ANÁLISIS DE LA UNIÓN *IN VIVO* DE NF- κ B A LOS PROMOTORES DE LA γ -GCS CATALÍTICA Y γ -GCS REGULADORA EN RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.



Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del hígado de animales controles y deficientes en vitamina E de 60 días (A) y 90 días (B). Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a NF- κ B fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de los promotores de la *gGCS* catalítica (*gGCSC*) y de la *gGCS* reguladora (*gGCSM*). Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor de la *a-actina*. Ac = Anticuerpo.

FIGURA IV.11. ANÁLISIS DE LA UNIÓN *IN VIVO* DE AP-1 A LOS PROMOTORES DE LA γ -GCS CATALÍTICA Y γ -GCS REGULADORA EN RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.



Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del hígado de animales controles y deficientes en vitamina E de 60 días (A) y 90 días (B). Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a AP-1 fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de los promotores de la g^{GCSC} catalítica (g^{GCSC}) y de la g^{GCSM} reguladora (g^{GCSM}). Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor de la α -actina. Ac = Anticuerpo.

Al igual que con la inmunoprecipitación de NF- κ B -DNA, se extrajo el DNA de las fracciones Input, Unido y Sin anticuerpo; se analizaron cantidades iguales de cada fracción, utilizando oligonucleótidos que amplificasen la región promotora de la **g**GCSC y de la **g**GCSM.

Tal como se muestra en la figura IV.11, en el caso de AP-1 no se encontraron diferencias significativas en el control transcripcional de esta proteína en condiciones basales y en condiciones sometidas a estrés oxidativo producido por la deficiencia en vitamina E.

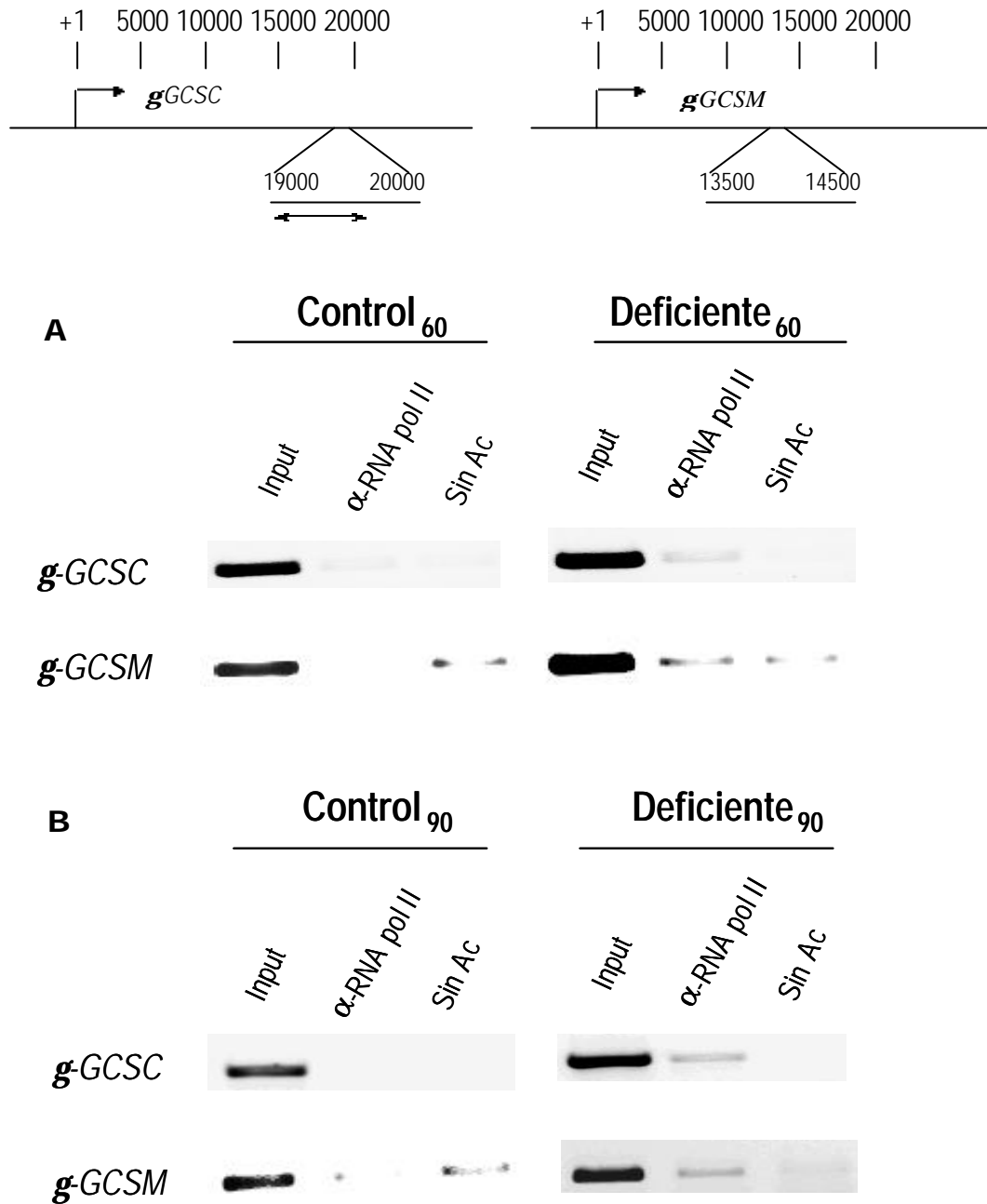
6.3. Inmunoprecipitación de los complejos RNA polimerasa II- DNA.

En nuestro modelo, hemos encontrado en ratas deficientes en vitamina E, que NF- κ B está activo y se encuentra unido al promotor de los genes que codifican ambas subunidades de la enzima γ -GCS. Nos propusimos averiguar si este hecho se traduce en una activación transcripcional de los genes, lo que implicaría la presencia de la RNA polimerasa II en la zona codificante de éstos.

Estudiamos la posible unión de la RNA polimerasa II a la zona transcribible de los genes que codifican las dos subunidades de la γ -GCS. Para ello empleamos una variante, puesta a punto en nuestro laboratorio, de la técnica del *ChIP assay*, que nos permite detectar la presencia de la RNA polimerasa II en la zona transcribible de los genes (Sandoval y cols, en prensa). Llevamos a cabo la inmunoprecipitación del complejo RNA polimerasa II -DNA, utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce a la RNA polimerasa II. Al igual que con la inmunoprecipitación de NF- κ B -DNA, se extrajo el DNA de las fracciones Input, Unido y Sin anticuerpo; se analizaron cantidades iguales de cada fracción, utilizando oligonucleótidos que amplificasen en este caso la región transcribible de la **g**GCSC; concretamente desde +19150 a +19509 pb desde el inicio de la traducción (Intrón 1- Exón 2) y de la **g**GCSM, desde +13845 a +14005 desde el inicio de la traducción (Intrón 3).

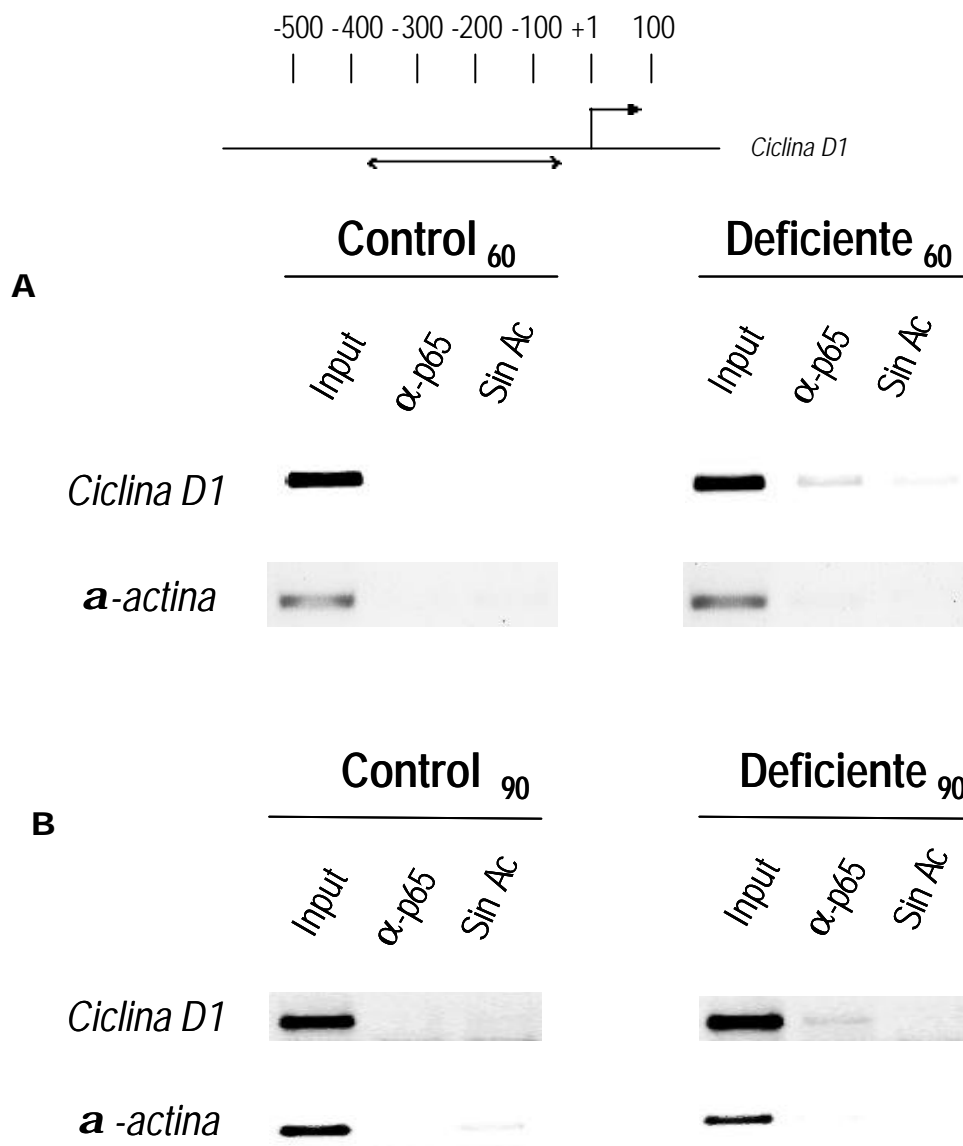
En la figura IV.12 se puede observar que en animales deficientes, la RNA polimerasa II se encuentra presente en la zona transcribible de los genes, lo que implica que está teniendo lugar su transcripción, produciéndose de forma más notoria a los 90 días de deficiencia.

FIGURA IV.12. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA *IN VIVO* DE RNA-pol II EN LA ZONA TRANSCRIBIBLE DE LA γ -GCS CATALÍTICA Y γ -GCS REGULADORA EN RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.



Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del hígado de animales controles y deficientes en vitamina E de 60 días (A) y 90 días (B). Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a RNA polimerasa II fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región codificante de la *gGCSC* catalítica (*gGCSC*) y de la *gGCS* reguladora (*gGCSM*). Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR.. Ac = Anticuerpo.

Figura IV. 13. ANÁLISIS DE LA UNIÓN *IN VIVO* DE NF- κ B AL PROMOTOR DE LA CICLINA D1 EN RATAS CONTROLES Y DEFICIENTES EN VITAMINA E.



Se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina fijada con formaldehído del hígado de animales controles y deficientes en vitamina E de 60 días (A) y 90 días (B). Los inmunoprecipitados obtenidos utilizando un anticuerpo frente a NF- κ B fueron alicuotados y posteriormente analizados por PCR utilizando oligonucleótidos específicos del promotor de la ciclina D1. Para cada caso se incluyó una muestra de la cromatina total (Input) en las reacciones de PCR. Como control negativo se incluyeron los productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos específicos para el promotor de la α -actina. Ac = Anticuerpo.

7. EFECTO DE LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA CICLINA D1 POR NF- κ B.

La ciclina D1 es otro de los genes cuya expresión se ve alterada en el hígado de los animales deficientes en vitamina E. El promotor de la ciclina D1 posee una secuencia de unión específica para NF- κ B.

Nos planteamos el estudio de la posible unión de este factor de transcripción del gen como respuesta al estrés oxidativo generado. Para ello se extrajo el DNA de las fracciones Input, Unido y Sin anticuerpo; se analizaron cantidades iguales de cada fracción, utilizando oligonucleótidos que amplificasen la región promotora de la ciclina D1, concretamente la zona comprendida entre -61 y -394 desde el inicio de la traducción.

Tal como se muestra en la figura IV.13, existe una unión de NF- κ B al promotor de la ciclina D1 en el hígado de animales deficientes, tanto a los 60 como a los 90 días, lo que pone de manifiesto su intervención en el incremento de expresión del gen en nuestro modelo de deficiencia.

“Dios no sólo juega a los dados, sino
que además los lanza dónde no
podamos verlos”

Stephen Hopkins

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La vitamina E es un nutriente esencial antioxidante que actualmente está recibiendo una considerable atención pública. El interés radica en recientes hallazgos científicos que sugieren que una ingesta óptima de esta vitamina puede ayudar a prevenir o a retrasar el comienzo de enfermedades tan importantes en nuestro tiempo como son el cáncer, aterosclerosis y otros trastornos cardiovasculares, así como enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer y el Parkinson e incluso el propio proceso de envejecimiento. El estrés oxidativo es un contribuyente importante en el establecimiento de todas estas alteraciones. Este hecho hace que los micronutrientes antioxidantes así como el mantenimiento de sus niveles dentro de un rango fisiológico, sean en la actualidad, objeto de gran interés clínico y social.

La vitamina E representa a una familia de compuestos relacionados estructuralmente, ocho de los cuales son de origen natural -aislados de materiales de origen vegetal, principalmente aceites-: α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol; además, actualmente disponemos de derivados sintéticos (Hofius y Sonnewald, 2003). Desde 1968, por promulgación de la *Food and Nutrition Board*, se reconoce oficialmente la naturaleza esencial de la vitamina E y la necesidad, por tanto, de abastecernos de ella a través de dieta y suplementos (Azzi y Stocker, 2000).

La administración específica de vitaminas es esencial en todas las edades, pero especialmente en personas mayores, ya que poseen mayor riesgo de deficiencia que los adultos. Un gran número de profesionales del campo de la geriatría afirman que, debido a las numerosas formas disponibles y fuentes de suplementación, su bajo coste, y su escasa toxicidad, la solución para la adecuada nutrición de vitaminas es asequible (Johnson y cols., 2002). Éstos recomiendan un complejo multivitamínico tomado diariamente, y hacen hincapié, en una suplementación extra de vitamina E para pacientes con factores de riesgo cardiovascular, demencia por Alzheimer, envejecimiento y otros (Miquel, 2001; Johnson y cols., 2002, Viña y cols., 2004).

Los estudios epidemiológicos, así como las pruebas de intervención aleatorias, en los que se ha estudiado los efectos beneficiosos de dosis farmacológicas de vitamina E, no han proporcionado resultados concluyentes en muchos de los casos. Cabe esperar

que un mejor conocimiento de los mecanismos de acción del α -tocoferol, así como de su control sobre la regulación génica, pueda ayudar a interpretar los procesos moleculares desencadenantes de las manifestaciones clínicas (Ricciarelli y cols., 2001).

Sin embargo, todos estos estudios sí que coinciden en que para obtener un efecto beneficioso para la salud por suplementación con vitamina E, los tratamientos deben ser prolongados, superiores a 10 años. De esta manera, se han encontrado efectos preventivos en procesos degenerativos tales como el envejecimiento, la enfermedad de Parkinson y determinados cánceres, como el de vejiga (Jacobs y cols., 2002; Farris y Zhang, 2003; Viña y cols., 2004).

Existen cada vez más indicios que sugieren que la ingesta dietética media de vitamina E es insuficiente para proteger la salud a largo plazo frente a las consecuencias provocadas por el estrés oxidativo (Bramley y cols., 2000). La deficiencia severa en vitamina E puede producirse como resultados de anormalidades genéticas en la α -TTP y como resultado de determinados síndromes de malabsorción (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). En los últimos años se han dado una serie de circunstancias, sobre todo en países desarrollados, que han provocado un descenso en la ingesta de esta vitamina (Parks y Traber, 2000), un incremento de sus necesidades (Johnson y cols., 2002) o ambos procesos de forma simultánea, que conducen en cualquier caso a que gran parte de la población no mantenga sus niveles de vitamina E dentro del rango óptimo fisiológico. Estos acontecimientos han sido, por un lado, la tendencia de la población a consumir dietas bajas en grasas (Peterson y cols., 1999) y, por otro lado, el envejecimiento de la población; dado que el envejecimiento es un proceso degenerativo en el que se produce un daño oxidativo celular y tisular, se requiere un aporte más elevado de todas las vitaminas antioxidantes, especialmente de la E. A todo esto podemos añadir que en países septentrionales, debido a hábitos alimentarios incorrectos, el 95% de la población no ingiere los niveles mínimos requeridos de vitamina E y es precisamente en estos países donde se ha descrito un mayor incidencia de mortalidad debido a accidentes coronarios y apoplejías (Duthie y cols., 1993; Ramírez-Tortosa y cols., 2001).

Además, es importante destacar que la cantidad de vitamina E se encuentra disminuida en el plasma e hígado de pacientes que cursan con enfermedades hepáticas, particularmente en alcohólicos (Tanner y cols., 1986; von Herbay y cols., 1994), así como en pacientes con cirrosis (Look y cols., 1999), fibrosis y fibrogénesis hepática (Kim y cols., 2000) y alteraciones hepatobiliares (Shirahata, 1999).

Por lo expuesto anteriormente, la deficiencia en vitamina E, al menos en un estado subclínico, es un problema que afecta a gran parte de la población y, por tanto, es de gran interés el estudio de los procesos moleculares que se ven afectados por esta deficiencia.

En el presente trabajo se ha establecido un modelo *in vivo* de deficiencia crónica en vitamina E para el estudio de los efectos que provoca esta carencia nutricional. Para ello, se utilizaron ratas macho de la raza Wistar que se dividieron en dos grupos experimentales: animales control y animales deficientes en vitamina E; cada grupo se subdividió en dos periodos de estudio, 60 y 90 días de vida. En el establecimiento de este modelo se tomó como punto de partida de la deficiencia el día del parto, ya que la vitamina E se considera un micronutriente esencial para el correcto desarrollo fetal en ratas y ratones (Brigelius-Flohé y cols., 2002). Con este procedimiento conseguimos reducir el periodo de inducción de deficiencia, al ser eliminado su aporte ya durante el periodo de lactancia y, además, hemos comprobado que ello no repercute en el crecimiento y desarrollo de las crías.

Los estudios realizados *in vivo* en animales para inducir deficiencia en vitamina E descritos por otros autores utilizan periodos muy variables y especies diferentes. Inicialmente se tomaron como periodos de deficiencia 30 y 50 días, basándonos en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, trabajando en un modelo de deficiencia crónica de otra vitamina liposoluble antioxidante (vitamina A) (Estornell y cols., 1997; Barber y cols., 2000; Borrás y cols., 2003). En los animales deficientes en vitamina A a los 50 días de vida, los niveles de retinol plasmáticos se encuentran por debajo del 15% del valor control, y la supervivencia de estos animales se ve comprometida pocos días después. Sin embargo, las ratas deficientes en vitamina E, necesitan un periodo mayor (90 días) para obtener un grado de deficiencia semejante y además en este periodo todavía no muestran signos aparentes de malnutrición ni otras alteraciones aparentes. A diferencia de otras deficiencias vitamínicas - tales como escorbuto, beriberi, raquitismo, pelagra- los efectos de la deficiencia en vitamina E se muestran a largo plazo, con manifestaciones características como malas condiciones del pelo, distrofia muscular, hipoescoliosis y trastorno de la marcha (Dexter y cols., 1994; Ralevic y cols., 1995) y se relacionan con enfermedades neurodegenerativas. Pese a la falta de alteraciones aparentes, la deficiencia en vitamina E pone tempranamente en marcha mecanismos moleculares como respuesta a determinadas alteraciones provocadas por la deficiencia, que han sido objeto de nuestro estudio.

La deficiencia en vitamina E provocada en las ratas se estableció por los bajos niveles de α -tocoferol plasmático y hepático. El análisis cromatográfico correspondiente al plasma de los animales deficientes mostraba un descenso notable en el pico correspondiente al α -tocoferol, que se veía acompañado, curiosamente, de un incremento del pico correspondiente al γ -tocoferol. Está claramente establecido que la suplementación con α -tocoferol provoca un descenso del γ -tocoferol en suero (Jiang y cols., 2001; Huang y Appel, 2003). Este hecho puede deberse a que el incremento de α -tocoferol en la ingesta provoca un incremento del metabolismo de éste, y en general de todos los isómeros de la vitamina E (Morinobu y cols., 2003). Esta razón podría explicar lo observado en nuestro modelo: un descenso del α -tocoferol provocaría un descenso de su metabolismo, y el consecuente descenso del metabolismo del resto de sus vitámeros, lo que provocaría un incremento de la cantidad de γ -tocoferol. La ausencia de γ -tocoferol en la dieta empleada en nuestros estudios plantea la hipótesis de una posible interconversión α -/ γ - tocoferol en el organismo (Elmadfa y cols., 1989).

El estrés oxidativo celular producido por la deficiencia en vitamina E ha sido bien establecido en diferentes tejidos por altos niveles de producción de ROS y cambios en la capacidad de defensa de los sistemas antioxidantes (Chow y cols., 1999; Burczynski y cols., 2001; Ramirez- Tortosa y cols., 2001; Shvedova y cols., 2002). Se ha descrito que el tejido neuronal y el músculo esquelético son los más vulnerables en respuesta a la depleción de vitamina E (Kayden, 1993; Thomas y cols., 1993). Estudios realizados por Yokota y cols. (2001) en ratones *knockout* de la α -TTP, proteína que se expresa principalmente en hígado, cerebro y retina, mostraron en estos animales síntomas propios de daño oxidativo en el sistema nervioso central y cerebro, ataxia, así como anormalidades histológicas en tejido muscular y cerebral.

Por el contrario, la morfología del hígado y la función mitocondrial hepática no parecen verse afectadas en ratas deficientes en vitamina E (Thomas y cols., 1993; Rafique y cols., 2001). En este sentido, estos autores han propuesto que el alto contenido de enzimas antioxidantes presentes en el hígado le otorga una protección mayor que al músculo frente a la depleción de vitamina E. Ito y cols. (1997), en un modelo concomitante de depleción de vitamina E y GSH, muestran alteración de la ultraestructura renal, mientras que la hepática no se ve alterada en estas condiciones.

Sin embargo, otros autores han descrito daño oxidativo hepático y alteraciones asociadas como consecuencia de la deficiencia en vitamina E. Ramírez- Tortosa y cols.

(2001) han demostrado un incremento de los niveles de 8-oxo-desoxiguanosina en el hígado de ratas deficientes. Saypil y cols. (1991) han estudiado la composición de ácidos grasos en lípidos totales y en fosfolípidos en varios tejidos de ratas deficientes en vitamina E, encontrando una gran afectación del hígado, con un notable incremento de los triacilglicerolos.

Además, la ausencia de cambios en la morfología del hígado y en la función mitocondrial hepática en la deficiencia en vitamina E demostrada por otros autores no implica que otras manifestaciones relacionadas con el estrés oxidativo no tengan lugar. De hecho, en trabajos previos realizados en este laboratorio, mostramos que la depleción hepática de otro antioxidante como es el *all-trans* -retinol (vitamina A) induce daño oxidativo, alteración del mtDNA y cambios en la expresión de genes implicados en el control de la proliferación sin alteraciones apreciables en la ultraestructura de la morfología hepática ni en su función respiratoria mitocondrial (Barber y cols., 2000; Estornell y cols., 2000; Borrás y cols., 2003).

En el presente estudio se muestra que la depleción hepática de vitamina E inducida mediante dieta sin vitamina E durante 90 días conlleva, en hígado total, a un descenso de los niveles de GSH, que juega un papel crucial protegiendo las células del estrés oxidativo, y un aumento del cociente GSSG/GSH. Además encontramos un incremento muy importante de los niveles de MDA, producto final de la peroxidación lipídica. El incremento de MDA no es sólo importante como parámetro para valorar la peroxidación lipídica, sino que este compuesto es en sí mismo un agente tóxico, que puede reaccionar con las bases de DNA e introducir lesiones mutagénicas que podrían dar lugar a diferentes tipos de alteraciones (Shuker y cols., 2002).

En nuestro modelo, el estrés oxidativo hepático generado por la deficiencia en vitamina E afecta también a las mitocondrias, en las que encontramos igualmente incrementado el MDA, y disminuidos los niveles de GSH, sin modificación de los niveles de GSSG; por tanto, encontramos un descenso del glutatión total en la mitocondria. El GSH entra en la mitocondria a través de un transportador específico que trabaja en contra de gradiente. Su actividad se altera por cambios en la fluidez de membrana, producidos por la adición de alcohol, los altos niveles de colesterol, etc. (Fernández- Checa, 2003; Colell y cols., 2004). El estrés oxidativo generado por la deficiencia en vitamina E provoca elevados niveles de MDA; este hecho podría alterar la composición, fluidez, funciones secretoras, así como funciones de transporte de las membranas, como ha sido demostrado en otros modelos de estrés oxidativo (Cross y

cols., 1987). Esto podría explicar los bajos niveles de glutatión, tanto oxidado como reducido hallados en la mitocondria. Evidentemente, sería necesario realizar estudios posteriores de la función del transportador mitocondrial de glutatión para poder establecer dicha relación.

Al igual que nosotros, otros autores han demostrado afectación mitocondrial causada por la deficiencia en vitamina E, determinada por el incremento del peróxido de hidrógeno mitocondrial. Este exceso de producción de ROS mitocondriales es el primer paso hacia el daño tisular observado en síndromes de deficiencia en vitamina E (Chow y cols., 1999). Así mismo, también se ha confirmado el efecto protector de la vitamina E en la mitocondria y su capacidad de revertir el daño mitocondrial, por restablecimiento de los niveles de peróxidos (Chow, y cols., 1999) o normalización de los niveles de MDA y GSH que se habían alterado previamente por tratamiento con butionina sulfoximida (BSO) (Rajasekaran, 2004). Debido a esta regulación de la producción de ROS mitocondriales, la vitamina E podría modular la expresión y activación de vías de transducción de señales sensibles al estado redox y por tanto retrasar o prevenir cambios tisulares degenerativos (Chow y cols., 1999).

El estrés oxidativo puede afectar a la conformación y/o a las actividades de muchas enzimas, receptores de membrana y proteínas que participan en la transducción de señales. Además los ROS actúan como mediadores fisiológicos del control transcripcional (Allen y Tresini, 2000). Entre los factores de transcripción sensibles al estado redox destaca NF- κ B.

Un amplio espectro de agentes exógenos y endógenos no relacionados, nocivos para el organismo son capaces de inducir la activación de NF- κ B, incluyendo entre ellos el estrés oxidativo, la infección viral, la lesión del DNA y los agentes quimioterapéuticos. NF- κ B juega un papel crucial en el crecimiento celular y diferenciación, apoptosis y respuesta adaptativa a cambios en el balance redox celular y la alteración de su regulación se ha asociado con la patogénesis de varias enfermedades, incluido el daño hepático. (Jones y Czaja, 1998; Mercurio y Manning, 1999; Boya y cols., 2001). Algunos autores, en estudios *in vitro*, han encontrado que una disminución de los niveles hepáticos de GSH tanto citosólico como mitocondrial, así como un incremento de la peroxidación lipídica, se correlacionan con una activación de NF- κ B y cambios en la expresión génica nuclear (García-Ruiz y cols., 1995; Bowie y cols., 1997; Rahman, 2000). Se ha visto que derivados de la vitamina E, como los ésteres

acetato y succinato del α -tocoferol son capaces de inhibir *in vitro* la activación de NF- κ B por distintos mecanismos (Suzuki y Packer 1993a; 1993b; Nakamura y cols., 1998); sin embargo, no se ha descrito hasta el momento ninguna correlación entre NF- κ B y deficiencia en vitamina E *in vivo*.

En este trabajo nosotros demostramos que en animales deficientes en vitamina E -en los que encontramos un descenso de GSH y un incremento de MDA- se produce la activación hepática de NF- κ B, siendo ésta, además, proporcional al tiempo de deficiencia. La activación de NF- κ B es uno de los mecanismos clave para entender la variación interindividual en la susceptibilidad a la enfermedad y su conocimiento es muy relevante para una optimización racional de los hábitos nutricionales (Flohé y cols., 1997).

En este estudio, hemos encontrado que se produce, además, una alteración del perfil de expresión génica en el hígado de los animales deficientes en vitamina E, que afecta a genes sensibles al estrés oxidativo, como es el caso de los genes que codifican las dos subunidades que forman la enzima γ -GCS, y otros implicados en el control del ciclo celular.

El estrés oxidativo potencialmente activa la capacidad de defensa antioxidante. La enzima γ -GCS cataliza el primer paso en la biosíntesis del GSH y se considera el paso limitante de esta vía; debido a esto, la regulación de sus subunidades ha sido un tema ampliamente investigado (Lu, 1999). En nuestro estudio, las ratas deficientes en vitamina E muestran un incremento significativo en la expresión hepática de los genes que codifican las dos subunidades que forman la γ -GCS. El hecho de que el hígado deficiente en vitamina E muestre elevados niveles de MDA y, sobre todo, el hecho de que se encuentre incrementado el cociente GSSG/GSH, muestra que la activación de la γ -GCS es insuficiente para contrarrestar el estrés oxidativo generado.

Un mismo estímulo no tiene por qué provocar la misma respuesta en ambas subunidades. Estudios *in vitro* han demostrado que estímulos tales como glucocorticoides o insulina que inducen el crecimiento acelerado del hepatocito, parecen activar únicamente la subunidad catalítica, γ -GCSC (Lu y cols., 1992; Cai y cols., 1997; Yang y cols., 2001a). En otros casos, como el tratamiento de hepatocitos con BSO, *tert*-butilhidroquinona o dietilmaleato, o tratamiento de ratas con tioacetamida se induce la expresión de ambas subunidades (Huang y cols., 2000); todos estos casos tienen en común que provocan estrés oxidativo e inducción de NF- κ B (Cai y cols., 1997).

Nuestro modelo, al igual que los resultados expuestos en estos últimos estudios induce estrés oxidativo, activación de NF- κ B e incremento de la expresión tanto de la subunidad catalítica, ***gGCSC***, como de la subunidad reguladora, ***gGCSM***.

En los procesos de señalización de la expresión génica de ***gGCSC*** y ***gGCSM***, NF- κ B puede jugar un papel muy importante, ya que posee sitios de unión en los promotores de ambos genes. En ratas, además, los promotores de los genes que codifican a las dos subunidades de la enzima γ -GCS no contienen el sitio de unión consenso al elemento ARE ("*antioxidant response element*"), que sí se encuentra presente en los promotores de estos genes en humanos (Yang y cols., 2001a). No obstante, Cai y cols. (1997), trabajando en cultivos de hepatocitos afirman que NF- κ B no está implicado en la activación de γ -GCSM. Autores como Yang y cols. (2001a) ponen de manifiesto las posibles contradicciones que se pueden encontrar *in vivo* e *in vitro* en el estudio de la alteración de la expresión génica de las subunidades que forman la γ -GCS como respuesta al estrés.

En el año 2001 se clonó y caracterizó la región promotora de los genes de la ***gGCSC*** y ***gGCSM*** de rata, encontrándose sitios de unión para AP-1 y NF- κ B (Yang y cols, 2001a, 2001b). Hasta el momento los ensayos que se han realizado para demostrar la funcionalidad de estos sitios de unión han sido de forma indirecta. El grupo de investigación de Lu ha llevado a cabo ensayos de EMSA utilizando oligonucleótidos de diferentes regiones del promotor de los genes que codifican ambas subunidades de la γ -GCS, así como análisis de protección de la DNasa I ("*footprinting*"). Estos mismos autores, mediante análisis por *nuclear run-on*, han demostrado regulación a nivel transcripcional de los genes ***gGCSC*** y ***gGCSM*** provocada por agentes que producen estrés oxidativo(Cai y cols. 1997).

En los animales deficientes en vitamina E, el aumento de la expresión hepática de los genes que codifican la subunidad catalítica y reguladora de la γ -GCS y la activación de NF- κ B no son fenómenos independientes que se producen de forma simultánea, sino que hemos demostrado de forma directa, mediante la técnica de *ChIP assay* que NF- κ B está unido al promotor de estos genes y que por tanto podría ser responsable, por lo menos en parte, de su incremento de expresión. Además, la presencia de la RNA polimerasa II en la zona transcribible simultáneamente a la unión de NF- κ B en ambos genes que se produce en animales deficientes en vitamina E, parece indicar que esta unión provoca la activación transcripcional de estos dos genes. Este

hecho muestra por primera vez la funcionalidad del sitio de unión de NF- κ B, y el potencial papel regulador que éste puede ejercer sobre las subunidades de la enzima limitante de la síntesis de glutatión en respuesta al estrés oxidativo. Así mismo, estos resultados ponen de manifiesto como el estrés oxidativo generado por la deficiencia en vitamina E es capaz de activar la regulación transcripcional de los genes que codifican la enzima γ -GCS mediante un mecanismo dependiente de NF- κ B.

El estrés oxidativo, severo o moderado, se traduce en señales intracelulares para la activación, diferenciación y proliferación celular (Nakamura, 2003). En este sentido, otro de los genes cuya expresión se ha visto alterada en nuestro modelo por la deficiencia en vitamina E es *c-jun*. *c-Jun* es una de las dianas fundamentales en las que convergen las vías de señalización que responden al daño hepático (Jones y Czaja, 1998) y se ha relacionado con la proliferación celular hepática. En nuestro modelo de daño hepático, como consecuencia de la deficiencia en vitamina E, observamos que *c-jun* responde activamente en esta situación y aumenta su expresión en el hígado. El incremento de la expresión del gen se tradujo en un aumento de la cantidad de proteína (resultados no mostrados).

La regulación del balance homeostático entre proliferación celular y muerte celular programada, apoptosis, es esencial para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares (Kanzler y Galle, 2000). Aunque el α -tocoferol no es considerado un agente apoptótico, un análogo suyo, el α -tocoferol succinato ha mostrado ser un potente inductor de apoptosis en líneas celulares tumorales. Existen numerosos indicios que apuntan a que la deficiencia en vitamina E no provoca apoptosis. Mutaku y cols. (2002) comprobaron en el tiroides que los niveles de vitamina E no afectan a la apoptosis, y que en animales deficientes en esta vitamina la actividad caspasa-3 no difería de los controles. Nosotros, en nuestro modelo, comprobamos que no se producía la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol en el hígado de ratas deficientes en vitamina E (resultados no mostrados). Si bien, a pesar de todo esto, se ha descrito que, en determinados órganos, como en el pulmón la célula se prepara para la apoptosis (Sinha y cols., 2002).

Respecto al efecto antiproliferativo de la vitamina E, en el hígado de nuestros animales deficientes en vitamina E se produce un aumento de la expresión de la *ciclina D1* y de la *ciclina E*, que además es proporcional con el tiempo de deficiencia. Así mismo, en estos animales encontramos un descenso en la expresión de *p21*, que codifica

a un inhibidor de las quinasas-ciclina-dependientes (CDKs), que es crítico en la detención de la célula en G₁, así como un incremento de la expresión de *c-jun*, cuya función proliferativa la ejerce a través de un control transcripcional directo sobre la *ciclina D1* (Wisdom y cols., 1999).

Además, demostramos, mediante la técnica de *ChIP assay*, que NF-κB es responsable, al menos en parte del incremento de expresión de la *ciclina D1*, ya que se encuentra presente en el promotor del gen en nuestro modelo de deficiencia.

Sin embargo, Fischer y cols. (2001) muestran que la expresión de la *gGCS*, así como de la *ciclina D1* no cambia en su modelo de deficiencia en vitamina E. La aparente discrepancia entre su trabajo y el nuestro podría explicarse por las diferentes técnicas experimentales utilizadas y el periodo de deficiencia estudiado. En nuestro caso, utilizamos un modelo experimental que induce una deficiencia crónica de vitamina E (las ratas son alimentadas con dieta sin vitamina E desde su nacimiento, a través de la leche materna, hasta los 90 días de vida), que es más largo que el periodo de deficiencia aplicado en el trabajo citado anteriormente (en el que las ratas fueron alimentadas con una dieta deficiente desde que pesaban 35g, durante 49 días).

En este mismo contexto, y apoyando los resultados encontrados en nuestro estudio, el grupo de investigación de Azzi, en 1995, demostró la inhibición de la proliferación de las células vasculares del músculo liso por efecto del α-tocoferol, ya que éste impedía la transición de las células de fase G₁ a S (Tasinato y cols, 1995). Este mismo grupo demostró años más tarde que el α-tocoferol, y el γ- con más potencia incluso, poseían la capacidad de inhibir a la ciclina D1 y a la ciclina E (Gysin y cols., 2002) lo que implica una disminución en la progresión hacia la fase S asociado con un descenso en la síntesis de DNA. En este mismo sentido, Trejo-Solis y cols. (2003) observan que el pretratamiento con vitamina E en una hepatectomía parcial disminuye la expresión de la *ciclina D1*.

Otros investigadores también han encontrado que la vitamina E es capaz de reducir la proliferación de diferentes tipos celulares en cultivo (Goldring y cols., 1993; Cuppini y cols., 2001) aunque el caso del hígado no ha sido descrito. Cuppini y cols. han demostrado el efecto antiproliferativo de la vitamina E *in vivo* en modelos de suplementación y proliferativo en modelos de deficiencia. De hecho, en modelos de suplementación demostraron que el α-tocoferol disminuía la proliferación celular e incrementaba la supervivencia, hecho que determinaron mediante inyección del

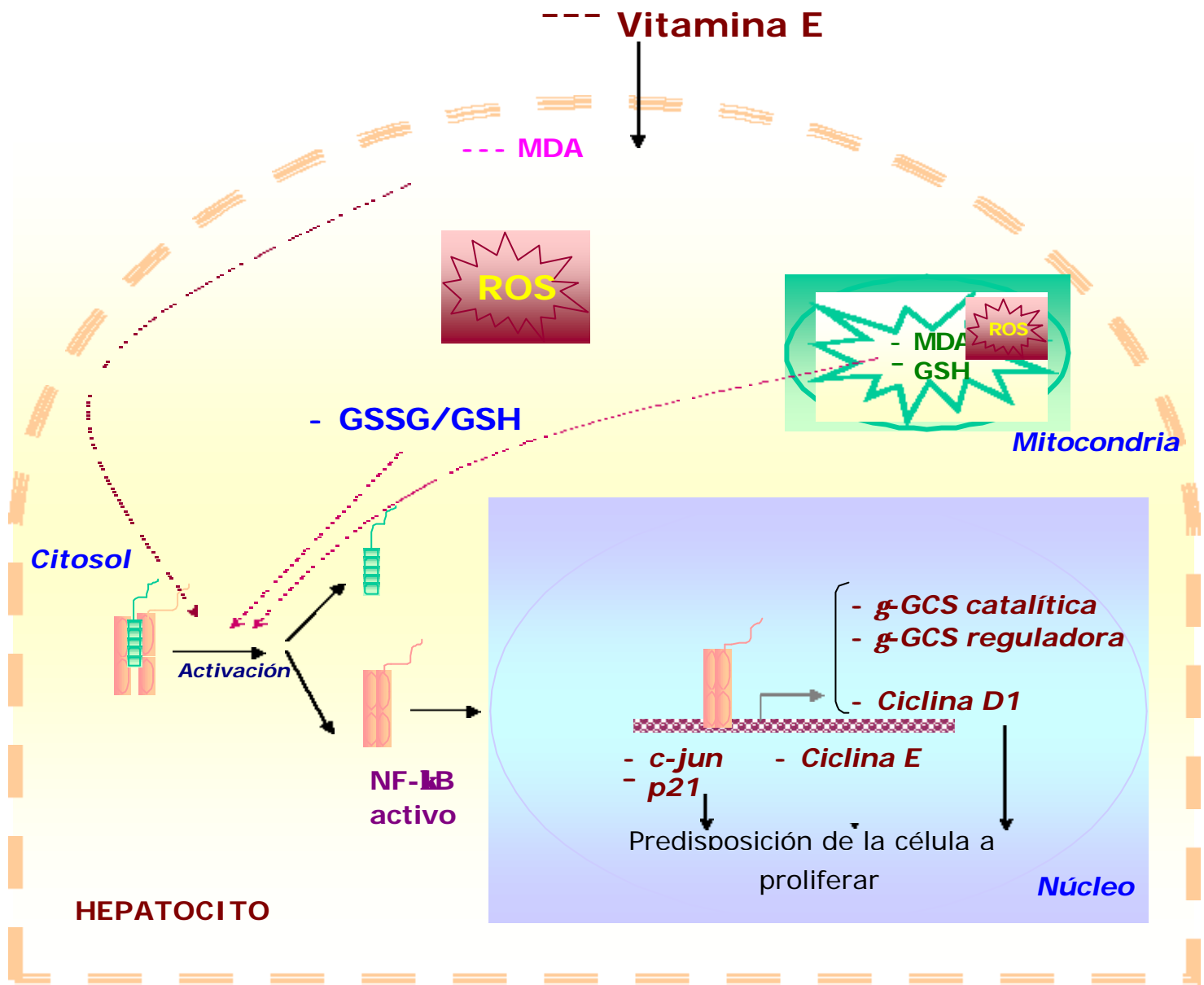
marcador mitótico 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (Cuppini y cols., 2001; Cecchini y cols., 2003). En ratas deficientes en vitamina E, observaron un incremento de la proliferación y un descenso de la supervivencia en células neuronales (Cecchini y cols., 1997; 1999; Ciaroni y cols., 2002); de ambos resultados dedujeron que el α -tocoferol inhibe la proliferación celular, pero al mismo tiempo, tiene un papel protector respecto a la muerte celular. Estos autores concluyen definiendo a la vitamina E como un factor exógeno capaz de controlar la proliferación celular. En estos estudios, así como en los realizados por Azzi y otros investigadores (Sylvester y cols., 2001) se sugiere que el control en la proliferación celular se ejerce por un mecanismo que implica cambios en la actividad de la PKC.

En nuestro caso, nuestros resultados demuestran la implicación de NF- κ B, sensor de estrés oxidativo hepático, en este proceso, pero este hecho no implica, necesariamente, que el mecanismo sea estrictamente antioxidante, ni que la PKC no pueda estar también involucrada en el mismo. Además nuestros estudios se centran en el hígado, tejido no analizado por estos autores.

En el hígado de animales deficientes se encuentra un incremento, progresivo con el periodo de deficiencia, de la expresión de los genes que codifican *ciclina D1*, *ciclina E* y *c-jun*, y un descenso de *p21*, siendo este un patrón característico en los mecanismos propios de la predisposición de la célula a la proliferación. Sin embargo es conveniente resaltar la falta de manifestaciones patológicas aparentes, así como la ausencia de cambios en la ultraestructura hepática en animales deficientes.

Como se ha comentado anteriormente, conviene destacar que numerosas enfermedades hepáticas cursan con deficiencia en vitamina E (Tanner y cols., 1986; von Herbay y cols., 1994; Look y cols., 1999; Shirahata, 1999; Kim y cols., 2000). Así mismo, los efectos nocivos causados por el daño hepático (como los producidos por el CCl_4) se revierten al administrar α -tocoferol (Britton y Bacon, 1994; Deulofeu y cols., 2000). Este hecho pone de manifiesto la importancia de mantener los niveles de vitamina E y el interés de conocer los mecanismos moleculares implicados en el descenso de los niveles y en sus consecuencias, así como en los efectos paliativos que produce su administración.

Figura V.1. PROCESOS MOLECULARES HEPÁTICOS EN LA DEFICIENCIA EN VITAMINA E



EL descenso de los niveles hepáticos de vitamina E provoca un incremento de la peroxidación lipídica y un incremento del cociente GSSG/GSH. En la mitocondria, se produce un incremento del MDA y un descenso del GSH. Estos procesos, entre otros, convergen en la activación de NF-κB. Éste, una vez activo, se transloca al núcleo, y se une al promotor de los genes de la gGCS. Esta unión provoca la presencia de la RNA polimerasa II en la zona transcribible de estos genes. NF-κB también se une al promotor de la ciclina D1, provocando un incremento de su expresión. Así mismo se produce un incremento de la ciclina E, c-jun y un descenso de p21, procesos todos ellos que predisponen al hepatocito a la proliferación.

En conclusión, mostramos que la depleción hepática de α -tocoferol *in vivo* provoca un estrés oxidativo caracterizado por un incremento en los niveles de MDA - celular así como mitocondrial- y una inversión del cociente GSSG/GSH hepático. Así mismo, se induce la activación de NF- κ B, se altera el perfil de expresión de genes, tales como γ -GCSC, γ -GCSM, *ciclina D₁*, *ciclina E*, *c-jun* y *p21* y en el caso de ***g***GCSC, γ -GCSM y la *ciclina D1* demostramos un control directo de NF- κ B sobre ellos. Este patrón de expresión alterado afecta tanto a genes marcadores de estrés oxidativo como a genes que controlan el ciclo celular (Figura V.1). Nuestros hallazgos demuestran que la deficiencia crónica en vitamina E induce procesos moleculares importantes relacionados con el daño celular hepático, y demuestran una intervención de NF- κ B activo en esta respuesta.

Nuestros datos están en concordancia con estudios experimentales y epidemiológicos que apoyan el papel protector de los tocoferoles para la integridad celular (Gysin y cols., 2002; Jacobs y cols., 2002) y enfatizan la importancia, en un contexto fisiológico, de mantener un consumo adecuado de vitamina E, no sólo para prevenir el daño oxidativo hepático sino también para modular la correcta transducción de señales.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Se ha establecido un modelo *in vivo* de deficiencia crónica en vitamina E en ratas mediante la administración de una dieta exenta de esta vitamina, desde el nacimiento hasta los 90 días de vida. No existen diferencias estadísticamente significativas en la ingesta y en el peso corporal entre animales control y deficientes en vitamina E. Así mismo no se produjeron alteraciones físicas apreciables en los animales deficientes durante el periodo que duró el estudio.
2. En el hígado de los animales deficientes en vitamina E los niveles de α -tocoferol disminuyen significativamente a los 60 y 90 días de deficiencia, hasta un 20 y un 10% del valor control, respectivamente. De forma paralela, se produce un incremento significativo de los niveles de MDA y del cociente GSSG/GSH hepático. Los animales deficientes en vitamina E muestran afectación mitocondrial, determinada por un incremento de los niveles de MDA y un descenso de los niveles de GSH mitocondriales, con respecto a los animales control. No se observan cambios en la ultraestructura hepática de animales deficientes en vitamina E respecto a los animales control.
3. En el hígado de animales deficientes se encuentra un incremento, progresivo con el periodo de deficiencia, de la expresión de los genes que codifican las dos subunidades que integran la enzima γ -GCS, limitante en la síntesis de glutatión, tiol cuya función es clave en la defensa antioxidante. Se produce también un aumento en animales deficientes de la expresión de *ciclina D1*, *ciclina E* y *c-jun*, y un descenso de *p21*, siendo este un patrón característico en los mecanismos propios de la predisposición de la célula a la proliferación.
4. Se ha establecido mediante ensayo de movilidad electroforética (EMSA) que el factor de transcripción NF- κ B se encuentra activado en el hígado de los animales deficientes en vitamina E. Dicha activación va acompañada de la unión del factor de transcripción a los promotores de los genes *gGCSC*, *gGCSM* y *ciclina D1*, como se ha demostrado mediante la técnica de *ChIP assay*. AP-1 no parece estar implicado

en el control transcripcional de las dos subunidades ***gGCSC***, ***gGCSM*** inducido por el estrés oxidativo debido a la deficiencia en vitamina E.

5. En el hígado de los animales deficientes en vitamina E, se demuestra que NF- κ B ejerce un control transcripcional sobre los genes ***gGCSC*** y ***gGCSM***, provocando la presencia de la RNA-polimerasa II en la zona transcribible de los genes que codifican a ambas subunidades.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adler, V.; Yin, Z.; Tew, K.D.; Ronai, Z. (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18**: 6104-6111

Albanese, C.; Johnson, J.; Watanabe, G.; Eklund, N.; Vu, D.; Arnold, A.; Pestell, R.G. (1995). Transforming p21^{ras} mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* **270**: 23589-23597

Allen, R.G.; Tresini, M. (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Rad. Biol. Med.* **28**: 463-499

Ametaj, B.N.; Nonnecke, B.J.; Franklin, S.T.; Horst, R.L.; Bidlack, W.R.; Stuart, R.L.; Beitz, D.C. (2000) Dietary vitamin A modulates the concentrations of RRR-alpha-tocopherol in plasma lipoproteins from calves fed milk replacer. *J Nutr.* **130**: 629-36

Aratri, E.; Spycher, S.E.; Breyer, I.; Azzi, A. (1999) Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **447**: 91-94

Arnaud, J.; Fortis, I.; Blanchier, S.; Kia, D.; Favier, A. (1991) Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **572**: 103-116

Arrigo, A.P. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.* **27**: 936-944

Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardó, F.V.; García de la Asunción, J.; Estrela, J.M.; Viña, J. (1994a) A high performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal. Biochem.* **217**: 323-328

Asensi, M.; Sastre, J.; Pallardó, F.V.; Estrela, J.M.; Viña, J. (1994b) Determination of oxidized glutathione in blood by high performance liquid chromatography. *Method. Enzymol.* **251**: 237-243

Azzi, A.; Stocker, A. (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog. Lipid Res.* **39**: 231-255

Azzi, A.; Breyer, I.; Feher, M.; Pastori, M.; Ricciarelli, R.; Spycher, S.; Staffieri, M.; Stocker, A.; Zimmer, S.; Zingg, J.M. (2000) Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *J. Nutr.* **130**: 1649-52

Azzi, A.; Ricciarelli, R.; Zingg, J.M. (2002) Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E) *FEBS Lett.* **519**: 8-10

Baeuerle, P.A.; Baltimore, D. (1996) NF-Kappa B: ten years after. *Cell* **87**: 13-20

- Ball, G.H.** (1998) Vitamin E. En *Bioavailability and Analysis of Vitamins in Foods* (Ball, ed) pp 195-232. Chapman & Hall, London
- Barber, T.; Borrás, E.; Torres, L.; García, C.; Cabezuelo, F.; Lloret, A.; Pallardo, F.V.; Viña, J.R.** (2000) Vitamin A deficiency causes oxidative damage to liver mitochondria in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:1-7
- Barrow, L.; Patel, H.R.; Tanner, M.S.** (1992) Alpha-tocopherol deficiency fails to aggravate toxic liver injury but liver injury causes alpha-tocopherol retention. *J. Hepatol.* **16**: 332-337
- Bauernfeind, J.B.** (1980) Tocopherols in Foods. En *Vitamin E: A Comprehensive Treatise* (Marcel Dekker, ed) pp 99-167. New York and Basel
- Beckman, K.B.; Ames, B.N.** (1998) The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* **78**: 547-581
- Beg, A.A.; Finco, T.S.; Nantermet, P.V.; Baldwin, A.S.Jr** (1993) Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I κ B: a mechanism for NF- κ B activation. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3301-3310
- Behl, C.; Davies, J.; Cole, G.M.; Schubert, D.** (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta-protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**: 944-950
- Behl, C.** (1999) Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **69**: 213-219
- Behrens, W.A.; Madere, R.** (1987) Mechanisms of absorption, transport and tissue uptake of RRR-alpha-tocopherol and d-gamma-tocopherol in the white rat. *J Nutr.* **117**: 1562-1569
- Bellizzi, M.C.; Franklin, M.F.; Duthie, G.G.; James, W.P.T.** (1994) , Vitamin E and coronary heart disease: the European paradox. *Eur. J. Clin. Nutr.* **48**: 822-831
- Bendich, A.; Machlin, L.J.** (1988) Safety of oral intake of vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **48**: 612-619
- Bendich, A.; Machlin, L.J.** (1993) The safety of oral intake of vitamin E: data from clinical studies from 1986 to 1991. En *Vitamins in Health and Disease*, (Packer and Fuchs, eds) pp 411-416. Marcel-Dekker, New York
- Bergmeyer, H.U.; Holder, M.; Rej, R.** (1986a) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **24**: 497-510
- Bergmeyer, H.U.; Holder, M.; Rej, R.** (1986b) International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation

(1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **24**: 481-495

Bieri, J.G.; Evarts, R.P. (1974) Vitamin E activity of gamma-tocopherol in the rat, chick and hamster. *J Nutr.* **104**: 850-857

Boaz, M.; Smetana, S.; Weinstein, T.; Matas, Z.; Gaften, U.; Iania, A.; Knecht, A.; Weissgarten, Y.; Brunner, D.; Fainaru, M.; Green, M.S. (2000) Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **356**: 1213-1218

Borras, E.; Zaragoza, R.; Morante, M.; Garcia, C.; Gimeno, A.; Lopez-Rodas, G.; Barber, T.; Miralles, V.J.; Viña, J.R.; Torres, L. (2003) In vivo studies of altered expression patterns of p53 and proliferative control genes in chronic vitamin A deficiency and hypervitaminosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1493-501

Boscoboinik, D.; Szewczyk, A.; Hensey, C.; Azzi, A. (1991) Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**: 6188-6194

Bowie, A.G.; Moynagh, P.N.; O'Neill, L.A. (1997) Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- κ B by tumour necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. *J. Biol. Chem.* **272**: 25941-25950

Boya, P.; Larrea, E.; Sola, I.; Majano, P.L.; Jiménez, C.; Civeira, M.P.; Prieto, J. (2001) Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression. *Hepatology* **34**: 1041-1048

Bramley, P.M.; Elmadfa, I.; Kafatos, A.; Kelly, F.J.; Manios, Y.; Roxborough, H.E.; Schuch, W.; Sheehy, P.J.A.; Wagner, K-H. (2000) Vitamin E (Review). *J. Sci. Food Agr.* **80**: 913 - 938

Brand, M.D.; Pamplona, R.; Portero-Otin, M.; Requena, J.R.; Roebuck, S.J.; Buckingham, J.A.; Clapham, J.C.; Cadenas, S. (2002) Oxidative damage and phospholipid fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. *Biochem. J.* **368**: 597-603.

Brigelius, R.; Merckel, C.; Akerboom, T.; Sies, H. (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 2529-2534

Brigelius-Flohé, R.; Traber, M.G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13**: 1145-1155

Brigelius-Flohé, R.; Kelly, F.J.; Salonen, J.T.; Neuzil, J.; Zingg, J.M.; Azzi, A. (2002) The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**: 103-116

- Britton, R.S.; Bacon, B.R.** (1994) Role of free radical in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology* **41**: 343-348
- Brown, M.S.; Goldstein, J.L.** (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**: 34-47
- Burczynsky, J.M.; Southard, S.J.; Hayes, J.R.; Longhurst, P.A.; Colby, H.D.** (2001) Changes in mitochondrial and microsomal lipid peroxidation and fatty acid profiles in adrenal glands, testes, and livers from alpha-tocopherol-deficient rats. *Free Rad. Biol. Med.* **30**: 1029 – 1035
- Burton, G.W.; Joyce, A.; Ingold, K.U.** (1982) First proof that vitamin E is the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* **2**: 327-328
- Burton, G.W.; Joyce, A.; Ingold, K.U.** (1983) Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Arch. Biochem. Biophys.* **221**: 281-290
- Burton, G.W.; Traber, M.G.; Acuff, R.V.; Walters, D.N.; Kayden, H.; Hughes, L.; Ingold, K.U.** (1998) Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E *Am. J. Clin Nutr.* **67**:669-684
- Cadenas, E.; Ginsberg, M.; Rabe, U.; Sies, H.** (1984) Evaluation of α -tocopherol antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation as detected by low-level chemiluminiscence. *Biochem. J.* **223**: 755-759
- Cai, J.; Huang, Z-Z.; Lu, C.** (1997) Differential regulation of γ -glutamylcysteine synthetase heavy and light subunit gene expression *Biochem. J.* **326**: 167-172
- Cecchini, T.; Ciaroni, S.; Reno, F.; Ferri, P.; Ambrogini, P.; Cuppini, R.; Papa, S.** (1997) Cell proliferation occurring during adult life is enhanced in vitamin E deficiency. *Eur. J. Histochem.* **41** : 95-96
- Cecchini, T.; Ferri, P.; Ciaroni, S.; Cuppini, R.; Ambrogini, P.; Papa, S.; Del Grande, P.** (1999) Postnatal Proliferation of DRG Non-Neuronal Cells in Vitamin E Deficient Rats. *Anat. Rec.* **256**: 109-115
- Cecchini, T.; Ciaroni, S.; Ferri, P.; Ambrogini, P.; Cuppini, R.; Santi, S.; Del Grande, P.** (2003) α - Tocopherol, an Exogenous Factor of Adult Hippocampal Neurogenesis Regulation. *J. Neurosci. Res.* **73**: 447-455
- Chen, F.E.; Huang, D.B.; Chen, Y.Q.; Ghosh, G.** (1998) Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-Kappa B bound to DNA. *Nature* **391**: 410-413
- Chen, L.H.; Liao, S.; Packett, L.V.** (1972) Interaction of dietary vitamin E and protein level or lipid source with serum cholesterol level in rats. *J. Nutr.* **102**: 729-732

Chojkier, M.; Houglum, K.; Lee, K.S.; Buck, M. (1998) Long- and short-term D-alpha-tocopherol supplementation inhibits liver collagen alpha (I) gene expression. *Am. J. Physiol.* **275**: G1480 - G1485.

Chomczynsky, P.; Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156 –159

Chow, C.K.; Ibrahim, W.; Wei, Z.; Chan, A.C. (1999) Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Rad. Biol. Med.* **27**: 580-587

Chupukcharoen, N.; Komaratat, P.; Wilairat, P. (1985) Effects of vitamin E deficiency on the distribution of cholesterol in plasma lipoproteins and the activity of cholesterol 7-hydroxylase in rabbit liver. *J. Nutr* **115**: 468-472

Ciaroni, S.; Cecchini, T.; Ferri, P.; Cuppini, R.; Ambrogini, P.; Santi, S.; Bebedetti, S.; Del Grande, P.; Papa, S. (2002) Neural precursor proliferation and newborn cell survival in the adult rat dentate gyrus are affected by vitamin E deficiency. *Neurosci. Res.* **44**: 369-377

Colell, A.; Garcia-Ruiz, C.; Mari, M.; Fernandez-Checa, J.C. (2004) Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. *FEBS Lett.* **560**: 63-8.

Collaborative Group of the Primary Prevention Project (PPP). (2001) Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project. *Lancet* **357**: 89-95

Collins, T.; Cybulsky, M.I. (2001) NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J. Clin. Invest.* **107**: 255-264

Coombes, J.S.; Rowell, B.; Dodd, S.L.; Demirel, H.A.; Naito, H.; Shanely, R.A.; Powers, S.K. (2002) Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**: 272-277

Cross, C.E.; Halliwell, B.; Borish, E.T.; Pryor, W.A.; Ames, B.N.; Saul, R.L.; McCord, J.M.; Harman, D. (1987) Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* **107**: 526-545

Cuppini, R.; Ciaroni, S.; Cecchini, T.; Ambrogini, P.; Ferri, P.; Del Grande, P.; Papa, S. (2001) α -tocopherol controls cell proliferation in the adult rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* **303**: 198-200

Cynamon, H.A.; Milov, D.E.; Valenstein, E.; Wagner, M. (1988) Effect of vitamin E deficiency on neurologic function in patients with cystic fibrosis. *Pediatr.* **113**: 637-640

Davies, K.J.A. (1999) The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells: a New Paradigm for Oxidative Stress. *IUBMB Life* **48**: 41 - 47

De Leve, L.; Kaplowitz, N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* **52**: 287-305

Deng, C.; Zhang, P.; Harper, J.W.; Elledge, S.J.; Leder, P. (1995) Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**: 675–684

Deryckere, F.; Gannon, F. (1994) A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* **16**: 405

Deulofeu, R.; Parés, A.; Rubio, M.; Gassó, M.; Román, J.; Giménez, A.; Varela-Moreiras, G.; Caballeria, J.; Ballesta, A.M.; Mato, J.M.; Rodés, J. (2000) S-Adenosylmethionine prevents hepatic tocopherol depletion in carbon tetrachloride-injured rats. *Clin. Sci.* **99**: 315-320

Devaraj, S.; Traber, M.G. (2003) Gamma-tocopherol, the new vitamin E? *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 530-531

Dexter, D.T.; Ward, R.J.; Wells, F.R.; Daniel, S.E.; Lees, A.J.; Peters, T.J.; Jenner, P.; Marsden, C.D. (1992) α -tocopherol levels in brain are not altered in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **32**: 591-593

Dexter, D.T.; Nanayakkara, I.; Goss-Sampson, M.A.; Muller, D.P.; Harding, A.E.; Marsden, C.D.; Jenner, P. (1994) Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport*. **5**:1773-6

Digman, J.D.; Lebovitz, R.M.; Roeder, R.G (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475-1489

Diplock, A.T. (1994) Antioxidants and disease prevention. *Mol. Aspects Med.* **15**: 293–376

Duthie, G.G.; Arthur, J.R.; Beattie, J.A.G.; Brown, K.B.; Morrice, P.C.; Robertson, J.D.; Shortt, C.T.; Walker, K.A.; James W.P.T. (1993) Cigarette smoking, antioxidants, lipid peroxidation and coronary heart disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **686**: 120–129

Dwyer, J. (2002) Nutritional requirements and dietary assessment. En *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Mc Graw-Hill, ed)
<http://harrisons.accessmedicine.com>

Eder, K.; Flader, D.; Hirche, F.; Brandsch, C. (2002) Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed salmon oil. *J. Nutr.* **132**: 3400-3404

Eichholzer, M.; Stahelin, H.B.; Gey, K.F.; Ludin, E.; Bernasconi, F. (1996) Prediction of male cancer mortality by plasma levels of interacting vitamins: 17-year follow-up of the prospective Basel study. *Int. J. Cancer* **66**: 145-150

Elmadfa, I.; Kim, S.W.; Reutlinger, M.; Siewert, R. (1989) The transformation of gamma-tocopherol to alpha-tocopherol in the animal organism; a generational study in rats *Z Ernährungswiss.* **28**: 36-48

- Enrione, E.B.; Weeks, O.I.; Kranz, S.; Shen, J.** (1999) A Vitamin E-Deficient Diet Affects Nerve Regeneration in Rats. *Nutrition* **15**: 140-144
- Eskelson, C.D.; Jacobi, H.P.; Fitch, D.M.** (1973) Some effects of vitamin E deficiency on in vitro cholesterol metabolism. *Physiol. Chem. Phys.* **5**:319-329
- Estornell, E.; Tormo, J.R.; Barber, T.** (1997) A deficiency in respiratory complex I in heart mitochondria from vitamin A-deficient rats is counteracted by an increase in coenzyme Q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**: 451-454
- Estornell, E.; Tormo, J.R.; Marin, P.; Renau-Piqueras, J.; Timoneda, J.; Barber, T.** (2000) Effects of vitamin A deficiency on mitochondrial function in rat liver and heart. *Brit. J. Nutr.* **84**: 927-934
- Evans, H.M.; Bishop, K.S.** (1922) Fetal resorption. *Science* **55**: 650
- Evans, P.; Halliwell, B.** (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit. J. Nutr.* **85**: S67-74.
- Evans, T.R.J.; Kaye, S.B.** (1999) Retinoids: present role and future potential. *British J. Cancer* **80**: 1-8
- Evstigneeva, R.P.; Volkov, I.M.; Chudinova, V.V.** (1998) Vitamin E as a universal antioxidant and stabilizer of biological membranes. *Membr. Cell Biol.* **12**:151-72
- Farris, M.W.; Reed, D.J.** (1987) High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Method. Enzymol.* **143**: 101-109.
- Farris, M.W.; Zhang, J-G.** (2003) Vitamin E therapy in Parkinson's disease. *Toxicology* **189**: 129-146
- Fasce, C.F. Jr.; Vanderlinde, R.E.** (1972) Factors affecting the results of serum cholesterol determinations: an interlaboratory evaluation. *Clin. Chem.* **18**: 901-908
- Fernandez-Calle, P.; Molina, J.A.; Jimenez-Jimenez, F.J.; Vazquez, A.; Pondal, M.; Garciaruiz, P.J.; Urra, D.G.; Domingo, J.; Codoceo, R.** (1992) Serum levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Parkinson's disease. *Neurology* **42**: 1064-1066
- Fernández-Checa, J.C; Lu, S. C.; Ookhtens, M.; DeLeve, L.; Runnegar, M.; Yoshida, H.; Saiki, H.; Kanan, R.; García-Ruiz, C.; Kuhlenkamp, J.F.; Kaplowitz, N.** (1992) The Regulation of Hepatic Glutathione. En *Hepatic Anion Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology*. pp 363-395. Marcel Dekker, New York
- Fernández-Checa, J.C; Kaplowitz, N.; García-Ruiz, C.; Collet, A.; Miranda, M.; Mai, M.; Ardite, E.; Morales, A.** (1997) GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am. J. Physiol.* **273**: G7-G17
- Fernandez-Checa, J.C.** (2003) Redox regulation and signaling lipids in mitochondrial apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**: 471-479.

- Fischer, A.; Pallauf, J.; Gohil, K.; Weber, S.U.; Packer, L.; Rimbach, G.** (2001) Effect of selenium and vitamin E deficiency on differential gene expression in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **285**: 470–475
- Flohé, L.; Brigelius-Flohé, R.; Saliou, C.; Traber, M.G.; Packer, L.** (1997) Redox regulation of NF-Kappa B activation. *Free Rad. Biol. Med.* **22**: 1115-1126
- Food and Nutrition Board.** (2000) Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. A report of the *Panel on Dietary Antioxidant and Related Compounds*. Washington, DC: National Academy of Sciences, pp 186-283
- Francavilla, R.; Miniello, V.L.; Brunetti, L.; Lionetti, M.E.; Armenio, L.** Hepatitis and cholestasis in infancy: clinical and nutritional aspects (2003) *Acta Paediatr. Suppl.* **91**: 101-4
- Freedman, J.E.; Farhat, J.H.; Loscalzo, J.; Keaney, J.F. Jr.** (1996) alpha-Tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation* **94**: 2434 - 2440.
- Fridovich, I.** (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 97-112
- Gann, P.H.; Ma, J.; Giovanucci, E.; Willet, W.; Sacks, F.M.; Hennekens, C.H.; Stampfer, M.J.** (1999) Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res.* **59**: 1225-1230
- García de la Asuncion, J.; Millan, A.; Pla, R.; Bruseghini, L.; Esteras, A.; Pallardo, F.V.; Sastre, J.; Viña, J.** (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.* **10**: 333-338
- Garcia-Ruiz, C.; Colell, A.; Morales, A.; Kaplowitz, N.; Fernandez-Checa, J.C.** (1995) Role of oxidative stress generated from the mitochondrial electron transport chain and mitochondrial glutathione status in loss of mitochondrial function and activation of transcription factor nuclear factor-kappa B: studies with isolated mitochondria and rat hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* **48**: 825–834.
- GISSI-Prevenzione Investigators.** (1999) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet* **354**: 447-455
- Goldring, C.E.P.; Rice-Evans, C.A.; Burdon, R.H.; Rao, R.; Haq, I.; Dilpock, A.T.** (1993) alpha-Tocopherol uptake and its influence on cell proliferation and lipid peroxidation in transformed and nontransformed baby hamster kidney cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**: 429-35.

- Guttridge, D.C.; Albanese, C.; Reuther, J.Y.; Pestell, R.G.; Baldwin, A.S.** (1999) NF- κ B controls cell growth and differentiation through the transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5785-5799
- Gysin, R.; Azzi, A.; Visarius, T.** (2002) γ -tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J.* **16**: 1952-1954
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.** (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.** (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford
- Halliwell, B.** (2000) The antioxidant paradox. *Lancet.* **355**: 1179-1180
- Handelman, G.J.; Epstein, W.L.; Pearson, J.; Spiegelman, D.; Machlin, L.J.; Dratz, E.A.** (1994) Human adipose alpha-tocopherol and gamma-tocopherol kinetics during and after 1 y of alpha-tocopherol supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**: 1025-32
- Harman, D.** (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300
- Harper, J.; Adami, G.R.; Wei, N.; Keyomarsi, K.; Elledge, S.J.** (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of the cyclin D-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816
- Hassan, H.M.** (1989) Microbial superoxide dismutases. En *Advances in Genetic* (Scandalios, ed) pp 65-97. Academic Press, San Diego
- Heffner, J.E.; Repine, J.E.** (1989) Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**: 531-54
- Hill, K.E.; Montine, T.J.; Motley, A.K.; Li, X.; May, J.M.; Raymond, F.B.** (2003) Combined deficiency of vitamins E and C causes paralysis and death in guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 1484-1488
- Hinz, M.; Krappmann, D.; Eichten, A.; Heder, A.; Scheidereit, C.; Strauss, M.** (1999) NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2690-2698
- Hodis, H.N.; Mack, W.J.; LaBree, L.; Mahrer, P.R.; Sevanian, A.; Liu, C.R.; Liu, C.H.; Hwang, J.; Selzer, R.H.; Azen, S.P.; VEAPS Research Group** (2002) alpha-Tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). *Circulation* **106**: 1453-1459
- Hofius, D.; Sonnewald, U.** (2003) Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* **8**: 6-8

- Hollander, D.; Rim, E.; Muralidhara, K.S.** (1975) Mechanism and site of small intestinal absorption of alpha-tocopherol in the rat. *Gastroenterology* **68**: 1492-1499
- (The) HOPE Study Investigators** (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* **342**: 154-160
- Hopkins, F.G.** (1921) On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J* **15**: 286-305
- Horwitt, M.K.** (2001) Critique of the requirement for vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 1003-1005
- Huang, C.; Anderson, M.E.; Meister, A.** (1993) Amino acid sequence and function of the light subunit of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **268**: 20578-20583
- Huang, H.Y.; Appel, L.J.** (2003) Supplementation of diets with alpha-tocopherol reduces serum concentrations of gamma- and delta-tocopherol in humans. *J. Nutr.* **133**: 3137-3140
- Huang, Z-Z; Yang, H.; Chen, C.; Zeng, Z.; Lu, S.C.** (2000) Inducers of γ -glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression. *Biochem. Biophys. Acta.* **1493**: 48-55
- Hwang, C.; Sinsky, A.J.; Lodish, H.F.** (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* **257**: 1496-1502
- Ip, C.** (1982) Dietary vitamin E intake and mammary carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* **3**: 1453-1456
- Ishii, K.; Zhen, L.X.; Wang, D.H.; Funamori, Y.; Ogawa, K.; Taketa, K.** (1996) Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**: 680-684
- Islam, K.N.; Devaraj, S.; Jialal, I.** (1998) alpha- Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells. *Circulation* **98**: 2255-2261
- Ito, K.; Yano, T.; Hagiwara, K.; Ozasa, H.; Horikawa, S.** (1997) Effects of Vitamin E Deficiency and Glutathione Depletion on Stress Protein Heme Oxygenase 1 mRNA Expression in Rat Liver and Kidney. *Biochem. Pharmacol.* **54**: 1081-1086
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)** (1982) Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendations 1981. *Eur. J. Biochem.* **123**: 473-475
- Izzo, J.G.; Papadimitrakopoulou, V.A.; Liu, D.D; den Hollander, P.L.C.; Babenko, I.M.; Keck, J.; El-Naggar, A.K. Shin, D.M.; Jack Lee, J. Hong, W.K.; Hittelman, W.N.** (2003) Cyclin D1 Genotype, Response to Biochemoprevention, and Progression rate to Upper Aerodigestive Tract Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **95**: 198-205

Jacobs, E.J.; Henion, A.K.; Briggs, P.J.; Connell, C.J.; McCullough, M.L.; Jonas, C.R.; Rodriguez, C.; Calle, E.E.; Thun, M.J. (2002) Vitamin C and vitamin E supplement use and bladder cancer mortality in a large cohort of US men and women. *Am J Epidemiol.* **156**: 1002-10

Jacques, P.F. (1999) The potential preventive effects of vitamins for cataract and age-related macular degeneration. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **69**: 198-205

Jialal, I.; Fuller, C.J.; Huet, B.A. (1995) The effect of α -tocopherol supplementation on LDL oxidation. A dose-response study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 190-198

Jiang, Q.; Christen, S.; Shigenaga, M.K.; Ames, B.N. (2001) gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**: 714-722

Johnson, K.A.; Bernard, M.A.; Funderburg, K. (2002) Vitamin nutrition in older adults. *Clin. Geriatr. Med.* **18**: 773-99

Jones, B.E.; Czaja, M.J. (1998) Mechanism of Hepatic Toxicity. III. Intracellular signaling in response to toxic liver injury. *Am. J. Physiol.* **275**: G874-G878

Joyce, D.; Bouzahzah, B.; Fu, M.; Albanese, C.; D'Amico, M.; Steer, J.; Klein, J.U.; Lee, R.J.; Segall, J.E.; Westwick, J.K.; Der, C.J.; Pestell, R.G. (1999) Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through an NF- κ B-dependent pathway. *J. Biol. Chem* **274**: 25245-25249

Joyce, D.; Albanese, C.; Steer, J.; Fu, M.; Bouzahzah, B.; Pestell, R.G. (2001) NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**: 73-90

Kanbagli, Ö.; Balkan, J.; Aykaç-Toker, G.; Uysal, M. (2002) Hepatic Mitochondrial Prooxidant and Antioxidant Status in Ethanol-Induced Liver Injury in Rats. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 1482 - 1484

Kanzler, S.; Galle, P.R. (2000) Apoptosis and the liver. *Cancer Biology* **10**: 173-184

Kaplowitz, N.; Tsukamoto H. (1996) Oxidative stress and liver disease. *Prog. Liver Dis.* **14**: 131-59

Kaplowitz, N. (2000) Mechanism of liver injury. *J. Hepatol.* **32**: 39-47

Kappus, H.; Diplock, A.T. (1992) Tolerance and safety on vitamin E: a toxicological position report. *Free Radic. Biol. Med* **13**: 55-74

Kaseki, H.; Kim, E.Y.; Whisler, R.L.; Cornwell, D.G. (1986) Effect of an oral dose of vitamin E on the vitamin E and cholesterol content of tissues of the vitamin E-deficient rat. *J. Nutr.* **116**: 1631-1639

- Kayden, H.J.; Silber, R.** (1965) The role of vitamin E deficiency in the abnormal autohemolysis of acanthocytosis. *Trans Assoc Am Physicians* **78**: 334-341
- Kayden, H.J.** (1993) The neurologic syndrome of vitamin E deficiency: a significant cause of ataxia. *Neurology* **43**: 2167-2169
- Keaney, J.F., Jr.; Frei, B.** (1994) Antioxidant protection of low density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease. En *Natural antioxidants in human health and disease*. (Frei, ed) pp 303 - 351. San Diego, CA; Academic Press.
- Kerr, L.D.** (1995) Electrophoretic mobility shift assay. *Method. Enzymol.* **254**: 619-663
- Kim, K.Y.; Choi, I.; Kim, S.S.** (2000) Progression of hepatic stellate cell activation is associated with the level of oxidative stress rather than cytokines during CCl₄-induced fibrogenesis. *Mol. Cells* **10**: 289-300
- Kinlay, S.; Fang, J.C.; Hikita, H.; Ho, I.; Delagrange, D.M.; Frei, B.; Suh, J.H.; Gerhard, M.; Creager, M.A.; Selwyn, A.P.; Ganz, P.** (1999) Plasma alpha-tocopherol and coronary endothelium-dependent vasodilator function. *Circulation* **100**: 219-221
- Kitazawa, S.; Kitazawa, R.; Maeda, S.** (1999) Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region. *J. Biol. Chem.* **274**: 28787-28793
- Koch, O.; Farré, S.; De Leo, M.E.; Palozza, P.; Palazzotti, B.; Borrelo, S.; Palombini, G.; Cravero, A.; Galeotti, T.** (2000) Regulation of manganese superoxide dismutase (Mn SOD) in chronic experimental alcoholism: effects of vitamin E-supplemented and -deficient rats. *Alcohol Alcohol.* **35**: 159-163
- Kowaltowsky, A.J.; Vercesi, A.E.** (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **26**: 463- 471.
- Kuhlenkamp, J.; Ronk, M.; Yusin, M.; Stolz, A.; Kaplowitz, N.** (1993) Identification and purification of a human liver cytosolic tocopherol binding protein. *Protein Expr. Purif* **4**: 382-389
- Leger, C.L.; Dumontier, C.; Fouret, G.; Boulot, P.; Descomps, B.A.** (1998) A short-term supplementation of pregnant women before delivery does not improve significantly the vitamin E status of neonates--low efficiency of the vitamin E placental transfer. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **68**: 293-299
- Li, N.; Karin, M.** (1999) Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* **13**: 1137-1143
- Lippman, R.D.** (1985) Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.* **20**: 1-5

- Livrea, M.A.; Tesoriere, L.** (1998) Antioxidant activity of vitamin A within lipid environments. En *Subcellular Biochemistry* (Quinn and Kagan, eds) pp 113-143. Plenum Press, New York
- Look, M.P.; Reichel, C.; von Falkenhausen, M.; Hahn, C.; Stockinger, K.; von Bergmann, K.; Rao, G.S.; Spengler, U.; Sauerbruch, T.** (1999) Vitamin E status in patients with liver cirrhosis: normal or deficient? *Metabolism* **48**: 86-91
- Lu, S.C.; Ge, J.L.; Kuhlenkamp, J.; Kaplowitz, N.** (1992) Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J Clin Invest.* **90**: 524-532
- Lu, S.C.** (1999) Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* **13**: 1169-1183
- Machlin, L.J.** (1989) Use and safety of elevated dosages of vitamin E in adults. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.* **30**: 56-68
- Mahmood, S.; Yamada, G.; Niiyama, G.; Kawanaka, M.; Togawa, K.; Sho, M.; Ito, T.; Sasagawa, T.; Okita, M.; Nakamura, H.; Yodoi, J.** (2003) Effect of vitamin E on serum aminotransferase and thioredoxin levels in patients with viral hepatitis C. *Free Radic. Res.* **37**:781-785
- Meister, A.** (1988) Glutathione. En *The liver: Biology and Pathobiology* (2^a ed) pp 401-417. Raven Press, New York
- Mercurio, F.; Manning, A.M.** (1999) NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* **18**: 6163-6171
- Meredith, M. J.; Reed, D.J.** (1982) Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte *J. Biol. Chem.* **257**: 3747-3753
- Meydani, S.N.; Tengerdy, R.P.** (1993) Vitamin E and immune response. En *Vitamin E in Health and Disease* (Packer y Fuchs, ed) pp 549-561. Marcel-Dekker, New York
- Meydani, S.N.; Meydani, M.; Blumberg, J.B.; Leka, L.S.; Pedrosa, M.; Diamond, R.; Schaefer, E. J.** (1998) Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 311-318
- Miquel, J.; Ecomonos, A.C.; Fleming, J.; Jonson, J.E. Jr.** (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* **15**: 579-591
- Miquel, J.** (2001) Nutrition and ageing. *Public Health Nutr.* **4**: 1385-1388
- Morel, Y.; Barouki, R.** (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* **342** : 481-96
- Morgulis, S.; Spencer, H.C.** (1936) Studies on the blood and tissues in nutritional muscular dystrophy. *J. Nutr.* **12**: 173-190

- Morinobu, T.; Yoshikawa, S.; Hamamura, K.; Tamai, H.** (2003) Measurement of vitamin E metabolites by high-performance liquid chromatography during high-dose administration of alpha-tocopherol. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**: 410-414
- Mutaku, J.F.; Poma, P.F.; Many, M-C.; Denef, J-F.; van den Hove, M-F.** (2002) Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goitre development and iodine-induced involution. *J. Endocrinol.* **172**: 375-386
- Nakamura, H.** (2003) Experimental and clinical aspects of oxidative stress and redox regulation. *Rinsho Byori.* **51**: 109-14
- Nakamura, T.; Goto, M.; Matsumoto, A.; Tanaka, I.** (1998) Inhibition of NF-kappa B transcriptional activity by alpha-tocopheryl succinate. *Biofactors* **7**: 21-30
- National Research Council** (1978). Nutrient requirements of Laboratory animals, 3^aed. National Academy of Sciences, Washington, DC
- National Research Council** (1985). Guide for the Care and Use of laboratory Animals. Publication no. 85-23 8rev.). National Institutes of Health, Washington, DC
- National Research Council** (1989). Recommended Dietary Allowances, 10^a ed. National Academy of Sciences, Washington, DC
- National Research Council** (1995). Nutrient requirements of Laboratory animals, 4^a ed. National Academy Press, Washington, DC
- National Research Council** (2000) Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. National Academy Press Washington, DC
- Niki, E.; Noguchi, N.; Tsuchihashi, H.; Gotoh, N.** (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E and β -carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1322S-1326S
- Nohl, H.; Hegner, D.** (1978) Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria. *FEBS Lett.* **253**: 5061-5063
- Ookhtens, M.; Kaplowitz, N.** (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin. Liver Dis.* **18**: 313-29
- Oriani, G.; Salvatori, G.; Maiorano, G.; Belisario, M.A.; Pastinese, A.; Manchisi, A.; Pizzuti G.** (1985) Vitamin E nutritional status and serum lipid pattern in normal weanling rabbits. *J. Nutr.* **115**: 468-472
- Pal, S.; Thomson, A.M.; Bottema, C.D.K.; Roach, P.D.** (2003) α -Tocopherol modulates the low density lipoprotein receptor of human HepG2 cells. *Nutr. J.* **2**: 3-13
- Palace, V.P.; Khaper, N.; Quin, Q.; Singal, P.K.** (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic. Biol. Med.* **26**: 746-761

Parks, E.; Traber, M.G. (2000) Mechanisms of Vitamin E Regulation: Research Over the Past Decade and Focus on the Future. *Antioxid. Redox Signal.* **2**: 405-412

Pasatiempo, A.M.; Taylor, C.E.; Ross, A.C. (1991) Vitamin A status and the immune response to pneumococcal polysaccharide: effects of age and early stages of retinol deficiency in rats. *J. Nutr.* **121**: 556-562

Peterson, S.; Sigman-Grant, M.; Eissenstat, B.; Kris-Etherton, P. (1999) Impact of adopting lower-fat food choices on energy and nutrient intakes of american adults. *J. Am. Diet. Assoc.* **99**: 177-183

Podda, M.; Weber, C.; Traber, M.G.; Milbradt, R. and Packer, L. (1999) Sensitive High - Performance Liquid Chromatography Techniques for Simultaneous Determination of Tocopherols, Tocotrienols, Ubiquinols, and Ubiquinones in Biological Samples. *Method. Enzymol.* **299**: 330 - 341

Prasad, K.N.; Edwards-Prasad, J. (1992) Vitamin E and cancer prevention: recent advances and future potentials. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**: 487-500

Pryor, W.A. (2000) Vitamin E and Heart Disease: Basic Science to intervention trials. *Free Rad. Biol. Med.* **28**: 141-164

Rafique, R.; Schapira, A.H.V.; Cooper, J.M. (2001) Sensitivity of respiratory chain activities to lipid peroxidation: effect of vitamin E deficiency. *Biochem. J.* **357**: 887-892

Rahman, I. (2000) Regulation of Nuclear Factor- κ B, Activator Protein-1, and Glutathione Levels by Tumor Necrosis Factor- α and Dexamethasone in Alveolar Epithelial Cells *Biochem. Pharmacol.* **60**: 1041-1049

Rajasekaran, N.S.; Devaraj, N.S.; Devaraj, H. (2004) Vitamin E prevents buthionine sulfoximine-induced biochemical disorders in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**: 91-99

Ralevic, V.; Milla, P.J.; Burnstock, G. (1995) Effects of chronic vitamin E deficiency on vascular function-a study of sympathetic nerves, smooth muscle and endothelium of the mesenteric arterial bed of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **116**: 2983-2988

Ramirez-Tortosa, C. ; Andersen, O.M. ; Gardner, P.T. ; Morrice, P.C.; Wood, S.G.; Duthie, S.J.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Rad. Biol. Med.* **31**: 1033-1037

Rapola, J.M.; Virtamo, J.; Haukka, J.K.; Heinonen, O.P.; Albanes, D.; Taylor, P.R.; Huttunen, J.K. (1996) Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of angina pectoris. *JAMA* **275**: 693-698

Reed, D.J.; Babson, J.R.; Beatty, P.W.; Brodie, A.E.; Ellis, W.W.; Potter, D.W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide and related thiols and disulfides. *Anal. Biochem.* **106**: 55-62

Reed, D.J.; Fariss, M.W.; Pascoe, G.A. (1986) Mechanism of chemical toxicity and cellular protective systems. *Fundam. Appl. Toxicol.* **6**: 591 - 597

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey G.C.Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J. Nutr.* **123**: 1939–1953

Reeves, P.G. (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A Diet. *J. Nutr.* **127**: 838S-841S

Ricciarelli, R.; Tasinato, A.; Clement, S.; Ozer, N.K.; Boscoboinik, D.; Azzi, A. (1998) alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.* **334**: 243-249

Ricciarelli, R.; Zingg, J.M.; Azzi, A. (2001) Vitamin E: role of a Janus molecule. *FASEB J.* **15**: 2314-2325

Rickwood, D.; Wilson, M.T.; Darley-USmar, V.M. (1987). En *Mitochondria: A practical approach* (Darley-USmar, Rickwood, Wilson, eds.) pp 1-16. Oxford, IRL Press Limited

Ricquier, D.; Bouillaud, F. (2000) The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3 StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* **345**: 161-179

Rubbo, H.; Radi, R.; Anselmi, D.; Kirk, M.; Barnes, S.; Butler, J.; Eiserich, J.P.; Freeman, B.A. (2000) Nitric Oxide Reaction with Lipid Peroxyl Radicals Spares α -Tocopherol during Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* **275**: 10812 – 10818

Russell, R.M. (2002) Vitamin and trace mineral deficiency and excess. En *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Mc Graw-Hill, ed) <http://harrisons.accessmedicine.com>

Saldeen, T.; Li, D.; Mehta, J.L. (1999) Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**: 1208 - 1215

Salonen, J.T.; Nyyssonen, K.; Salonen, R.; Lakka, H.M.; Kaikkonen, J.; Porkkala-Sarataho, E.; Voutilainen, S.; Lakka, T.A.; Rissanen, T.; Leskinen, L.; Tuomainen, T.P.; Valkonen, V.P.; Ristonmaa, U.; Poulsen, H.E. (2000) Antioxidant Supplementation in Atherosclerotic Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamin E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **248**: 377-386

Sampson, D.A.; Jansen, G.R. (1984) Measurement of milk yield in the lactating rat from pup weight gain. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **3**: 613-617

Sancho-Tello, M.; Renau-Piqueras, J.; Baguena-Cervellera, Guerri, C. (1987) A biochemical and stereological study of neonatal rat hepatocyte subpopulations. Effect of pre- and postnatal exposure to ethanol. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **54**:170-181

Sandoval, J.; Rodriguez, J.L.; Tur, G.; Serviddio, G.; Pereda, J.; Boukaba, A.; Sastre, J.; Torres, L.; López-Rodas, G.; Franco, L. *RNA Pol-ChiP*: a novel procedure for the análisis of *real time* gene transcription. *Nucl. Acids. Res.*, en prensa

Saypil, W.H.; Shimasaki, H.; Ueta, N. (1991) Free radical-induced liver injury. I. Effects of dietary vitamin E deficiency on triacylglycerol level and its fatty acid profile in rat liver. *Free Radic. Res. Commun.* **14**: 315-322

Schüep, W.; Rettenmainer, R. (1984) Analysis of Vitamin E Homologs in Plasma and Tissue: High-Performance Liquid Chromatography. *Method. Enzimol.* **234**: 294-302

Schultz, M.; Leist, M.; Petrzika, M.; Gassmann, B.; Brigelius-Flohé, R. (1995) Novel urinary metabolite of alpha-tocopherol, 2,5,7,8-tetramethyl-2(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman, as an indicator of an adequate vitamin E supply? *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1527S-1534S

Schwenke, D.C. (2002) Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? *J. Nutr. Biochem.* **13**: 2-20

Sen, R.; Baltimore, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**: 705-716

Sheppard, A.J.; Pennigton, J.A.T.; Weihrauch, J.L. (1993) Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. En *Vitamin E in Health and Disease* (Packer y Fuchs, eds) pp 9-31. Marcel-Dekker, New York

Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677

Shirahata, A. (1999) Hepatobiliary and pancreatic disorders as risk factors for fat-soluble vitamin deficiencies. *Nippon Rinsho* **57**: 2371-2375

Shklar, G.; Schwartz, J.L. (1993) Effects of vitamin E on oral carcinogenesis and oral cancer. En *Vitamin E in Health and Disease* (Packer y Fuchs, eds) pp 497-511. Marcel-Dekker, New York

Shuker, D.E.; Atkin, W.; Bingham, S.A.; Leuratti, C.; Singh, R. (2002) Malondialdehyde-DNA adducts in relation to diet and disease risk. A brief overview of recent results. *IARC Sci. Publ.* **156**: 475-80

Shvedova, A.A.; Kisin, E.; Murray, A.; Smith, C.; Castranova, V.; Kommineni, C. (2002) Enhanced oxidative stress in the skin of vitamin E deficient mice exposed to semisynthetic metal working fluids. *Toxicology* **176**: 135-143

Sies, H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. En *Oxidative Stress* (Sies, ed) pp 1-8. Academic Press, London

Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**: 213-219

Sies, H.; Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**: 1315S - 1321S

- Simon, E.J.; Eisengart, A.; Sundheim, L.; Milhoart, A.T.** (1956) The metabolism of vitamin E. Purification and characterisation of urinary metabolites of alpha-tocopherol. *J. Biol. Chem.* **221**: 807-817
- Sinha, P.; Kolleck, I.; Volk, H-D.; Schlame, M.; Rüstow, B.** (2002) Vitamin E deficiency sensitizes alveolar type II cells for apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta* **1583**: 91-98
- Sokol, R.J.** (1988) Vitamin E deficiency and neurologic disease. *Annu Rev Nutr.* **8**: 351-373
- Sokol, R.J.** (1993) Vitamin E deficiency and neurological disorders. En *Vitamin E in Health and Disease*, (Packer y Fuchs, eds) pp 815 - 849. Dekker, New York
- Sokol, R.J.; Butler-Simon, N.; Conner, C.; Heubi, J.E.; Sinatra, F.R.; Suchy, F.J.; Heyman, M.B.; Perrault, J.; Rothbaum, R.J.; Levy, J.** (1993) Multicenter trial of d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate for treatment of vitamin E deficiency in children with chronic cholestasis. *Gastroenterology* **104**: 1727 - 1735
- Spencer, V.A.; Sun, J-M.; Li, L.; Davie, J.R.** (2003) Chromatin immunoprecipitation; a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* **31**: 67-75
- Stephens, N.G.; Parsons, A.; Schofield, P.M.; Kelly, F.; Cheeseman, K.; Mitchinson, M.J.** (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* **347**: 781-786
- Stocker, R.; Bowry, V.W.; Frei, B.** (1991) Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**: 1646-1650
- Stone, W.L.; Papas, A.M.** (1997) Tocopherols and the etiology of colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 1006-1014
- Stone, W.L.; LeClair, I.; Ponder, T.; Baggs, G.; Barrett Reis, B.** (2003) Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**: 899-906
- Suzuki, Y.J.; Packer, L.** (1993a) Inhibition of NF-kappa B DNA binding activity by alpha-tocopheryl succinate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**: 693-700
- Suzuki, Y.J.; Packer, L.** (1993b) Inhibition of NF-kappa B activation by vitamin E derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 277-83
- Sylvester, P.W.; McIntyre, B.S.; Gapor, A.; Briski, K.P.** (2001). Vitamin E inhibition of normal mammary epithelial cell growth is associated with a reduction in protein kinase C (alpha) activation. *Cell Prolif.* **34**: 347-357
- Szasz, G.; Gruber, W.; Bernt, E.** (1976) Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin. Chem.* **22**: 650-656

- Tanner, A.R.; Bantock, I.; Hinks, L.; Lloyd, B.; Turner, N.R.; Wright, R.** (1986) Depressed selenium and vitamin E levels in an alcoholic population. Possible relationship to hepatic injury through increased lipid peroxidation. *Dig. Dis. Sci.* **31**: 1307-1312
- Tappel, A.L.** (1962) Vitamin E: biological antioxidant. *Vitam. Horm.* **20**: 493-510
- Tasinato, A.; Boscoboinik, D.; Bartoli, G.M.; Maroni, P.; Azzi, A.** (1995) d-alpha-Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12190-12194
- Thomas, P.K.; Cooper, J.M.; King, R.H.M.; Workman, J.M.; Schapira, A.H.; Goss-Sampson, M.A.; Muller DP.** (1993) Myopathy in vitamin E deficient rats: muscle fibre necrosis associated with disturbances of mitochondrial function. *J. Anat.* **183**: 451-461
- Tonkonogi, M.; Fernström, M.; Walsh, B.; Ji, L.L.; Rooyackers, O.; Hammarqvist, F.; Wernerman, J.; Sahlin, K.** (2003) Reduced oxidative power but unchanged antioxidative capacity in skeletal muscle from aged humans. *Eur. J. Physiol.* **446**: 261-269
- Traber, M.G.; Kayden, H.J.** (1984) Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**: 747-751
- Traber, M.G.; Ingold, K.U.; Burton, G.W.; Kayden, H.J.** (1988) Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R-alpha-tocopherol in human lipoproteins. *Lipids* **23**: 791-797
- Traber, M.G.; Burton, G.W.; Hughes, L.; Ingold, K.U.; Hidaka, H.; Malloy, M.; Kane, J.; Hyams, J.; Kayden, H.J.** (1992) Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **33**: 1171-1182
- Traber, M.G.** (1996) Biokinetics of vitamin E. En *Handbook of Antioxidants*, (Cadenas y Packer, eds) pp 43-61. Marcel-Dekker, New York
- Traber, M.G.; Sies, H.** (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 321-347
- Traber, M.G.; Rader, D.; Acuff, R.; Ramakrishnan, S.; Brewer, H.B.; Kayden, H.J.** (1998) Vitamin E dose response studies in humans using deuterated RRR- α -tocopherol. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 847-853
- Traber, M.G.; Arai, H.** (1999) Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 343-355
- Traber, M.G.** (2001) Does Vitamin E Decrease Heart Attack Risk? Summary and Implications with Respect to Dietary Recommendations *J. Nutr.* **131**: 395S-397S

Traenckner, E.B.; Wilk, S.; Baeuerle, P.A (1994) A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. *EMBO. J.* **13**: 5433-5441

Trejo-Solis, C.; Chagoya De Sanchez, V.; Aranda-Fraustro, A.; Sanchez-Sevilla, L.; Gomez-Ruiz, C.; Hernandez-Munoz, R. (2003) Inhibitory effect of vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Lab. Invest.* **83**: 1669-1679

Upston, J.M.; Kritharides, L.; Stocker, R. (2003) The role of vitamin E in atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **42**: 405-422

USP. The United States Pharmacopeia 24. (1999) National formulary 19. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention

Vahlquist, A. (1999) What are natural retinoides?. *Dermatology* **199**: 3-11

Van Haaften, R.; Haenen, G.; Evelo, C.; Bast, A. (2003) Effect of vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. *Drug Metab. Rev.* **35**: 215-253

Vincent, S.; Marty, L.; Fort, P. (1993) S26 ribosomal protein RNA: an invariant control for gene regulation experiments in eucaryotic cells and tissues. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1498

Viña, J.; Viña, J.R.; Saez, G. (1986) Glutathione: metabolism and physiological functions. *Life Chem. Rep* **4**: 1-35

Viña, J.; Lloret, A.; Orti, R.; Alonso, D. (2004) Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* **25**: 117-23

Von Herbay, A.; de Groot, H.; Hegi, U.; Stremmel, W.; Strohmeyer, G.; Sies, H. (1994) Low vitamin E content in plasma of patients with alcoholic liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. *J. Hepatol.* **21**: 687-688

Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-330

Weinmann, A.S.; Farnham, P.J. (2002) Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods.* **26**:37-47

Weiss, S.J. (1986). Oxygen, ischemia, inflammation. *Acta Physiol. Scand.* **548**: 9-37

Wells, J.; Farnham, P.J. (2002) Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods* **26**:48-56

Willett, W.C.; Stampfer, M.J.; Underwood, B.A.; Taylor, J.O.; Hennekens, C.H. (1983) Vitamins A, E, and carotene: effects of supplementation on their plasma levels. *Am. J. Clin. Nutr.* **38**: 559-566

- Winston, G.W.** (1990) Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. En *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimatization Mechanismes*. pp 57-86. Wilwy-Liss, Inc
- Wisdom, R.; Jonson, R.S.; Moore, C.** (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanism. *EMBO J.* **18**:187-197
- Wollemberger, A.; Ristau, O.; Sohoffa, G.** (1960) Eine eine einfache technik der extrem schnellen abkuehlung groeberer. *Pflujers Arch.* **270**: 399-412
- Wong, S.H.; Knight, J.A.; Hopfer S.M.; Zaharia, O.; Leach, Ch.N. Jr.; Sunderman, W. Jr.** (1987) Lipoperoxides in Plasma as Measured by Liquid – Chromatographic Separation of Malondialdehyde – Thiobarbituric Acid Adduct. *Clin. Chem.* **33**: 214-220
- Wu, C-C.; Hoek, F.J.; Groenink, M.; Reitsma, P.H.; van Deventer, S.J.; Chamuleau, R.A.** (1997) Correlation of repressed transcription of alpha-tocopherol transfer protein with serum alpha-tocopherol during hepatocarcinogenesis. *Int. J. Cancer.* **71**: 686-690
- Xu, M.J.; Plezia, P.M.; Alberts, D.S.; Emerson, S.S.; Peng Y.M.; Sayers, S.M.; Liu, Y.; Ritenbaugh, C.; Gensler, H.L.** (1992) Reduction in plasma or skin alpha-tocopherol concentration with long-term oral administration of beta-carotene in humans and mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**: 1559-1565
- Yang, H.; Wang, J.; Huang, Z-Z.; Ou, X.; Lu, S.C.** (2001a) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit . *Biochem. J.* **357**: 447-455
- Yang, H.; Wang, J.; Ou, X.; Huang, Z-Z.; Lu, S.C.** (2001b) Cloning and Analysis of the Rat Glutamate-Cysteine Ligase Modifier Subunit Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **285**: 476-482
- Yano, T.; Yano, Y.; Horikawa, S.; Ozasa, H.; Okada, S.; Otani, S.; Hagiwara, K.** (1998) Regenerative Response in Acute Renal Failure Due to Vitamin E Deficiency and Glutathione Depletion in Rats. *Biochem. Pharmacol.* **56**: 543-546.
- Yasuda, M.; Fujita, T.; Mizunoya, Y.** (1979) Liver and plasma lipids in vitamin E deficient rats. *Chem Pharm Bull* **27**:447-451
- Yokota, T.; Igarashi, K.; Uchihara, T.; Jishage, K.; Tomita, H.; Inaba, A.; Li, Y.; Arita, M.; Suzuki, H.; Mizusawa. H.; Arai H.** (2001) Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha -tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**: 15185-15190
- Yoneda, M.; Hasegawa, T.; Nakamura, K.; Tamano, M.; Kono, T.; Terano, A.** (2004) Vitamin E therapy in patients with NASH. *Hepatology* **39**: 568
- Young, D.S.; Pestaner, L.C.; Gibberman, V.** (1975) Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem.* **21**:1D-432D

Yoshida, N.; Yoshikawa, T.; Manabe, H.; Teresawa, Y.; Kondo, M.; Noguchi, N.; Niki, E. (1999) Vitamin E protects against polymorphonuclear leukocyte-dependent adhesion to endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* **65**: 757 - 763

Zimmer, S.; Stocker, A.; Sarbolouki, M.N.; Spycher, S.E.; Sassoon, J.; Azzi, A. (2000) A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **275**: 25672-25680

